SELEKTION 12ß–HYDROXYLIERENDER ZELLSTÄMME VON DIGITALIS LANATA UND UMWANDLUNG VON ß–METHYLDIGITOXIN DURCH FERMENTERKULTUREN

DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MARIANNE HEINS
aus Lüneburg

1978

SELEKTION 12ß–HYDROXYLIERENDER ZELLSTÄMME VON DIGITALIS LANATA UND UMWANDLUNG VON ß–METHYLDIGITOXIN DURCH FERMENTERKULTUREN

DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MARIANNE HEINS
aus Lüneburg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	10. Februar 1978
Dekan:	Prof. Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Reinhard
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Auterhoff

FOTO - SCHNELLDRUCK Hans - Joachim Köhler - 74 TÜBINGEN - Neue Strasse 11

Die vorliegende Arbeit wurde im März 1974 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. E. Reinhard am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen begonnen und im August 1977 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. E. Reinhard danke ich herzlich für die Übertragung des Themas, sein Interesse an der Arbeit und seine jederzeit freundliche Unterstützung bei deren Durchführung.

Die Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0079

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

2,4-D	:	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DC	:	Deslanosid C
Gluc.	:	Glucose
Glyk.	:	Glykoside
h	:	Stunde
LA	:	Lanatosid A
LC	:	Lanatosid C
MDg	:	ß-Methyldigoxin
MDt	:	ß-Methyldigitoxin
min	:	Minute
Nl	:	Normliter (Luft bei 2000 mbar, 20°C)
PA	:	Purpureaglykosid A
ppm	:	mg/l
TG	:	Trockengewicht
Upm	:	Umdrehungen pro Minute
	:	Substratzugabe im Umwandlungsversuch

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung 1

B Problemstellung 5

C Material und Methoden 6

1. Kulturen 7

2. Chemikalien 7

3. Nährmedien 8

4. Geräte 11

5. Kulturbedingungen 12

a) Stationäre Kulturen 12

b) Schüttelkulturen für Vorversuche 12

c) Suspensionskulturen für Screening 12

d) Fermenterkulturen 12

6. Versuchsanordnung bei Umwandlung 13

a) Schüttelkulturen 13

b) Fermenterkulturen 13

7. Analytik 14

a) Extraktionsverfahren 14

b) Dünnschichtchromatographie 15

c) Auswertung 16

D Anlegen von Kulturen für Screening 17

1. Stationäre Kulturen von Digitalis lanata 18

2. Suspensionskulturen von Digitalis lanata 20

E Vorversuche 22

1. Dunkelstamm E (Zugabe von ß-Methyldigitoxin) 23

2. Lichtstamm E (Zugabe von ß-Methyldigitoxin) 23

3. Lichtstamm E im Dunkel (Zugabe von ß-Methyldigitoxin) 27

4. Lichtstamm E (Zugabe von Lanatosid A) 30

5. Stamm B2 (Zugabe von ß-Methyldigitoxin) 32

6. Stamm B2 (Zugabe von Digitoxin) 32

7. Stamm 364 (Zugabe von ß-Methyldigitoxin) 35

8. Stamm 364 (Zugabe von Digitoxin) 35

9. Diskussion 37

F Screening - Umwandlung von ß-Methyldigitoxin 39
Zellstamm 72 40
Zellstämme 128, 130, 216, 228, 285 40
Zellstamm 287 in NII- und G18-Medium 49
Zellstamm 291 in NII- und G18-Medium 53
Zellstämme 293, 293 BHL, 347, 445, 447, 508 58
Zellstämme 9-14, 10-2, 22-6, 23-17 65
Zellstamm E in G18- und NII-Medium 72
Zusammenstellung der Screening-Ergebnisse 76
Glykosidverteilung in Zellkulturen nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin 80
Diskussion der Screening-Ergebnisse 89
G Versuche zur Ausbeutesteigerung 95
Zellstamm 285 95
Zellstamm 291 (Mehrfachzugabe) 97
H Substratvariation mit Zellstamm 291 99
Zugabe von Lanatosid A 99
Zugabe von Digitoxin 102
I Fermenterversuche 104
1. Vorbereitung von Zellkulturen für Fermentationsversuche 105
2. Fermenterkultur E 106
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei freilaufendem pH 106
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 6,0 108
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 7,0 110
3. Fermenterkultur 291 112
Zugabe von ß-Methyldigitoxin 112
Mehrfachzugabe von ß-Methyldigitoxin 116
Zugabe von ß-Methyldigitoxin in verkürzter Fermentation 118
4. Diskussion der Fermenterversuche 121
K Zusammenfassung 125
L Literaturverzeichnis 128

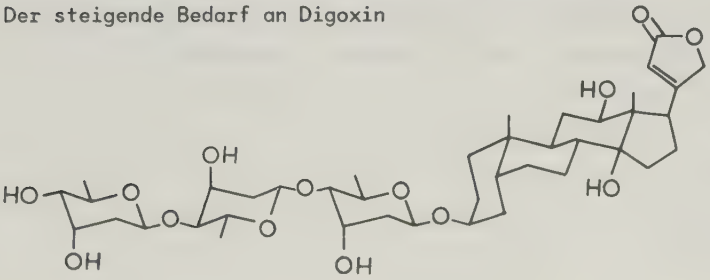
A Einleitung

Herzglykoside des Cardenolidtyps stellen eine bedeutende Gruppe medizinisch-therapeutisch angewandter Naturstoffe dar.

Voraussetzungen für die Wirksamkeit solcher Steroide sind neben Substitutionen am Ringgerüst deren sterische Anordnung sowie Ringverknüpfungen (AUTERHOFF). Ein derart kompliziertes Molekül ist synthetisch schwer zugänglich.

Zur Behandlung der Herzinsuffizienz werden heute vorwiegend Digoxin und seine partialsynthetischen Abkömmlinge eingesetzt. Sie zeichnen sich durch günstigere Pharmakokinetik als das von ihnen verdrängte Digitoxin aus (MUTSCHLER).

Der steigende Bedarf an Digoxin



wird nach wie vor durch Isolierung aus gesammelten und angebauten Digitalis lanata Ehrh. - Pflanzen gedeckt. Verbesserungen in der Gewinnung waren somit in erster Linie von Fortschritten der Pflanzenzüchtung abhängig.

Seit der Entwicklung der Zellkulturforschung bieten sich dem Naturstoffchemiker neue Wege, Stoffwechselvorgänge in pflanzlichen Zellen zu beobachten und aufzuklären.
Grundlegende Arbeiten zur Kultivierung isolierter Pflanzenzellen aus Kallusgewebe liegen vor von WHITE (1954), GAUTHERET (1959) und HILDEBRANDT (1962). Weitere Übersichten geben BLAKELY und STEWARD (1964), CAREW und STABA (1965), GRÜTZMANN (1966), STREET und HENSHAW (1966), STEWARD et al. (1970), BAJAJ und BOPP (1971) und KOBLITZ (1972).

Zellkulturen zahlreicher Arznei- und Nutzpflanzen wurden auf Sekundärstoffwechselprodukte untersucht. Zusammengefaßt sind die Ergebnisse bei REINHARD (1967), BECKER (1969) und TEUSCHER (1973).

Über das Vorhandensein von Cardenoliden in Digitalis-Zellkulturen liegen teilweise sich widersprechende Aussagen vor. BÜCHNER und STABA (1964) hatten Extrakte aus Digitalis-Zellkulturen gewonnen, die eine positive Kedde-Reaktion (KEDDE 1947) zeigten. Identifizierbare Glykoside wurden lange Zeit nicht gefunden. KARTNIG (1976) konnte geringe Mengen von Cardenoliden in den ersten Monaten nach Etablierung von Oberflächenkulturen von Digitalis purpurea und Digitalis lanata nachweisen.

Um zu klären, wo die Cardenolidbiogenese in Digitalis-Zellkulturen unterbrochen ist, wurden zahlreiche Arbeiten mit Zugabe von Vorstufen unternommen von GRAVES und SMITH (1967), FURUYA (1968), PILGRIM (1972) und HELMBOLD (1977).

Über Umwandlungsversuche mit Digitoxin berichteten STOHS und STABA (1965) und FURUYA et al. (1970 und 1972). Beobachtet wurden Glucosidierung und 16ß-Hydroxylierung.

Veränderungen von Steroiden durch Mikroorganismen wurden zusammenfassend dargestellt von CHARNEY und HERZOG (1967). Durch Streptomyceten konnte Digitoxin 12ß-hydroxyliert werden (NOZAKI et al.1965).

REINHARD (1974) und REINHARD, BOY und KAISER (1975) zeigten, daß Digitalis lanata - Zellkulturen nach Zugabe von Digitoxigenin-Derivaten die 12ß-Hydroxylierung durchführen können. BOY (1975) gelang es, mit Submerskulturen von Digitalis lanata-Zellstamm 72 ß-Methyldigitoxin in ß-Methyldigoxin umzusetzen.

Dieses Ergebnis war Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

Die in dieser Arbeit auftretenden Glykoside sind der A-Reihe mit Digitoxin als Sekundärglykosid oder der C-Reihe mit Digoxin als Sekundärglykosid zuzuordnen. Die entsprechenden Genine sind an C-3 des Steroidgerüstes mit 3 Molekülen Digitoxose glykosidisch verknüpft. Eine Übersicht über Sekundär- und Primärglykoside gibt die folgende Aufstellung:

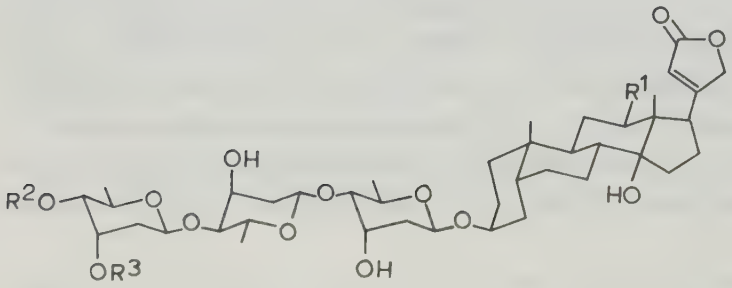


Abb. 1

	R^1	R^2	R^3
Digitoxin	H	H	H
ß-Methyldigitoxin	H	$-CH_3$	H
Purpureaglykosid A	H	-Glucose	H
Lanatosid A	H	-Glucose	-acetyl
Digoxin	OH	H	H
ß-Methyldigoxin	OH	$-CH_3$	H
Deslanosid C	OH	-Glucose	H
Lanatosid C	OH	-Glucose	-acetyl

B Problemstellung

Bei der Aufarbeitung von Pflanzenmaterial zur Gewinnung von Digoxin fällt Digitoxin zu einem Drittel der Gesamtglykosidmenge als Nebenprodukt an.
Diese Arbeit soll einen Beitrag leisten, Möglichkeiten zur Nutzbarmachung dieses teuren "Abfallproduktes" zu finden.
REINHARD (1974) konnte die 12ß-Hydroxylierung an Digitalis lanata - Zellkulturen nachweisen. Durch diese Reaktion werden Cardenolide der A-Reihe in solche der C-Reihe überführt. Ausgehend von der Arbeit von BOY (1975) sollten Verbesserungen zur Nutzung dieser Umwandlungsreaktion entwickelt werden. Angriffspunkte ergaben sich auf dem Sektor des eingesetzten Gewebematerials und auf dem Gebiet des Umwandlungsverfahrens.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst Selektion besonders geeigneter Zellstämme erfolgen. Gesucht wurden Stämme, die in kurzer Zeit zugesetztes Substrat vollständig hydroxylieren konnten, ohne Nebenprodukte zu bilden.

Um größtmögliche Mengen Glykosid durch pflanzliches Gewebe umzusetzen, sollte die Reaktion in größeren Maßstab übertragen werden. An dieser Stelle konnte auf Erfahrungen von WAHL (1977) zurückgegriffen werden. Es war gelungen, die Kultivierung und Umwandlung durch 12ß-Hydroxylierung an Digitalis lanata - Zellstamm 72 in einem Eigenbau-Airlift-Fermenter zu optimieren. Dieses Verfahren sollte durch Einsatz geeigneterer Zellkulturen weiter verbessert werden, um als technischer Prozess für die pharmazeutische Industrie wirtschaftliches Interesse zu gewinnen.

C Material und Methoden

1. Kulturen

a) Als Agarkulturen wurden folgende Zellstämme von Digitalis lanata Ehrh. übernommen:
72 293 364 E B2

b) Im April 1974 wurden von der Fa. Boehringer GmbH, Mannheim, Digitalis lanata - Hochleistungspflanzen mit einem Mindestgehalt von 0,4 % Digoxin zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt des beginnenden Blütensproßtriebes wurden von diesen Pflanzen Stengel-Kallus-Kulturen angelegt siehe unter D 1.

c) Im Auftrag der Arbeitsgruppe waren 1973 in Griechenland Samen von Digitalis lanata Ehrh. ssp. leucophaea (Sibth. et Sm.) Werner von verschiedenen Standorten gesammelt worden. Aussaat und Aufzucht folgten im Gewächshaus in Tübingen. 1975 wurden Antheren von Knospen mit 5 bis 7 mm Durchmesser entnommen und zum Anlegen von Kallus-Kulturen verwendet. Die Beschreibung des Verfahrens folgt unter D 1.

2. Chemikalien

Außer den gesondert aufgeführten wurden alle eingesetzten Chemikalien bezogen von

Merck AG, Darmstadt.

Von den folgenden Firmen wurden verwendet:

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: Casamino Acids Vitamin Free

Fluka AG, Buchs, Schweiz: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Aethylendiamin-tetraessigsäure-dinatriumdihydrat

Herzglykoside als Substrate und Vergleichssubstanzen wurden zur Verfügung gestellt von

Boehringer GmbH, Mannheim.

3. Nährmedien

a) Nährmedium nach NITSCH und NITSCH (1969) - NII mit 30 % Cocosmilch (Angaben in mg/l)

NH_4NO_3	720
KNO_3	950
$CaCl_2 \times 2H_2O$	220
$MgSO_4 \times 7H_2O$	185
KH_2PO_4	68
$MnSO_4 \times 1H_2O$	18,9
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	10
H_3BO_3	10
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,2
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025
Fe-EDTA	40
myo-Inosit	100
Glycin	2
Nicotinsäure	5
Thiamin-HCl	0,5
Pyridoxin-HCl	0,5
Biotin	0,05
Folsäure	0,5
Cocosmilch	300 ml/l
Saccharose	20 g/l
Agar bei stationären Kulturen	6,5g/l

b) Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) - G18
mit modifiziertem Kinetin/Auxin-Verhältnis
(Angaben in mg/l) pH 5,5

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Fe-EDTA	42,8
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \times 1H_2O$	18,4
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	10,6
KJ	0,83
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025
Glycin	2
myo-Inosit	100
Nicotinsäure	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Pyridoxin-HCl	0,5
Kinetin	2
Indolylessigsäure	1
Caseinhydrolysat	1000
Saccharose	60 g/l
Agar bei stationären Kulturen	9 g/l

Für die Fermentationsversuche und die entsprechenden Vorkulturen (siehe dort) wurde Saccharose als C-Quelle durch 20 g/l Glucose ersetzt. Glucose wurde eingeführt wegen der besseren Kontrollierbarkeit. Die relativ niedrige Konzentration sollte das Kulturwachstum beschleunigen.

Zunächst war das für die Kultivierung von Digitalis-Gewebe übliche Nährmedium nach NITSCH und NITSCH (1969) verwendet worden. Im Hinblick auf die Fermentation wurde nach einem definierten Medium gesucht. Der hohe Cocosmilch-Zusatz ließ die NII-Nährlösung als ungeeignet für Fermentervolumina erscheinen. Das Grundmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) mit modifiziertem Kinetin/Auxin-Verhältnis hatte sich in Wachstumsversuchen von HAGEDORN (unveröffentlicht) mit Digitalis lanata - Zellstamm 72 bewährt.

Es zeigte sich, daß alle im Verlauf dieser Arbeit untersuchten Zellkulturen gutes Wachstum in NII-Nährmedium aufwiesen. Jedoch war nur bei einigen die Kultivierung in G18-Nährlösung möglich.

4. Geräte

Schüttelmaschinen

Inkubationsrundschüttelmaschinen der
Fa. Infors AG, Basel, Schweiz

Gefriertrocknung

Gefriertrocknungsanlage Typ Delta IA der
Fa. Christ, Osterode/Harz

Fermenterzubehör

pH-Meß- und Regelanlagen der Firmen
B. Braun, Melsungen
Metrohm AG, Herisau, Schweiz
Elektroden Typ 465 der Fa. Ingold, Zürich, Schweiz
Membranpumpen Fe 211 der Fa. B. Braun, Melsungen

Glucoseanalyzer

Fa. Beckman Instruments, Fullerton, USA
Messung des O_2-Verbrauchs bei der Oxidation
von Glucose durch GOD

Spektralphotometer

Chromatogrammspektralphotometer PMQ II der
Fa. Zeiss, Oberkochen nach STAHL (1962)
Schreiber UR 400 der Fa. Vitatron GmbH, Forsbach
Integrator CRS 309 der Fa. Infotronics

5. Kulturbedingungen

a) Stationäre Kulturen

Siehe "Anlegen von Kulturen" unter D 1.

b) Schüttelkulturen für Vorversuche

Gewebe der schon auf Agar vorhandenen Zellstämme wurde in 300 ml - Erlenmeyerkolben mit Schikane bei einer Beleuchtung von 2000 Lux durch Philips TLD 15W/33 - Leuchtstoffröhren auf Schüttelmaschinen kultiviert. Die Schüttelfrequenz betrug 60 Upm.

Zu Passagenbeginn wurden 30 g abgetropfte Zellmasse in 50 ml frische Nährlösung eingewogen. Die Dauer einer Kulturpassage belief sich auf 28 Tage.

c) Suspensionskulturen für Screening

5 g Gewebe in 25 ml Nährlösung wurden in 100 ml - Erlenmeyerkolben mit 100 Upm bei 24°C geschüttelt. Auf besondere Beleuchtung wurde verzichtet.

Umgeimpft wurde je nach Wachstum des Zellstammes in Intervallen von 14 oder 21 Tagen.

d) Fermenterkulturen

Die Kulturbedingungen der Suspensionskulturen als Fermentervorzucht werden ausführlich besprochen unter I 1 "Vorbereitung von Zellkulturen für Fermentationsversuche".

6. Versuchsanordnung bei Umwandlung

a) Schüttelkulturen

Für die Vorversuche wurde vor Substratzugabe das ausgewachsene Gewebe vollständig in neues Kulturmedium überführt. Die Umwandlungsversuche im Stämme-Screening wurden während einer normalen Kulturpassage durchgeführt.
3 Tage nach Umsetzen des Gewebes in neue Nährlösung wurde Glykosid zugesetzt.
Für je einen Schüttelkolben mit 50 ml Inhalt wurden 2 mg Substrat in 1 ml, für Kulturen in 25 ml Nährmedium wurde 1 mg Substrat in 0,5 ml Aethanol 40 % gelöst. Durch ein Membranfilter der Fa. Sartorius, Göttingen (Porengröße 0,2 µ) wurde die Lösung sterilfiltriert und anschließend unter aseptischen Bedingungen in die Schüttelkolben einpipettiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden zu jeder Probenahme 3 Kolben abgeerntet.

b) Fermenterkulturen

Für die Zugabe von ß-Methyldigitoxin wurden 800 mg entsprechend 40 mg/l in 49 ml Aethanol 99 % gelöst, mit Wasser auf 70 ml verdünnt, sterilfiltriert und dem Fermenter mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min eingetropft.
Die erhöhte Aethanolkonzentration von 70 % wurde gewählt, um Lösungsmittelvolumen einzusparen und bei Mehrfachzugabe ein Auskristallisieren der Substanz in der Vorlage zu verhindern. Wegen des hohen Luftdurchsatzes im Fermenter und der Veratmung des Aethanols durch die Kultur stellte diese Konzentrationserhöhung kein Risiko dar.

7. Analytik

a) Extraktionsverfahren

Zur Auswertung der Umwandlungsversuche wurden die Proben über Seitz-Filter in Gewebefraktion und Kulturfiltrat getrennt.

Extraktion der Cardenolide aus dem Kulturfiltrat

Am Rotationsverdampfer wurde das Kulturfiltrat bei 50°C bis fast zur Trockne eingeengt und anschließend mit 100 ml Methanol 20 Minuten lang am Rückfluß extrahiert. Nach Filtration verdünnte man die Untersuchungslösung mit Wasser auf einen Methanolgehalt von 60 % und schüttelte 3 mal mit je 30 ml Chloroform aus.
Nach restlosem Abdestillieren des Lösungsmittels aus den gesammelten Chloroformphasen wurde der Rückstand in 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen.
Zur Auswertung auf Dünnschichtplatten kamen 1 bis 3 µl.

Extraktion der Cardenolide aus der Gewebefraktion

Das gefriergetrocknete Gewebe wurde nach der Trockengewichtsbestimmung pulverisiert und mit Methanol 80 % nach LIGETI (1957) analog dem Kulturfiltrat ausgezogen. Bei stark chlorophyllhaltigen Zellstämmen wurde eine Reinigung mit Petrolaether vorgenommen (KAISER 1966, KARTNIG und DANHOFER-NÖHAMMER 1972). Die Cardenolide wurden aus dem auf 60 % verdünnten Methanolauszug mit 3 mal 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. In der Fortsetzung wurde verfahren wie mit den Kulturfiltraten.

b) Dünnschichtchromatographie

Plattenmaterial

DC-Platten Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Merck AG, Darmstadt (Schichtdicke 0,25 mm)

Auftragen der Extrakte

1 bis 3 µl punktförmig mit 1 µl Microcaps Drummond

Fließmittel

Chloroform/Methanol/Wasser 80:18:2 (Pharm. Helv. VI)

Methylaethylketon wassergesättigt
nur für Primärglykoside (MIYATAKE et al. 1957, STEIDLE 1963).

Xylol/Methylaethylketon/Formamid 40:60:2 oder 50:50:2 (v/v)
nur für Sekundärglykoside.
Zur Entwicklung in diesem Laufmittel mußten die Dünnschichtplatten vor Verwendung mit Formamid imprägniert werden.
Dies geschah durch Tauchen in Formamid/Aceton 20 % (v/v) und anschließendem Lufttrocknen (KAISER 1955, SONANINI 1964, HAMMERSTEIN und KAISER 1972).

Detektion

Das von JENSEN (1953) eingeführte Sprühreagenz wurde von KAISER (1955) übernommen:

15 Volumenteile einer 25 %igen Trichloressigsäurelösung in Aethanol 99 %
1 Volumenteil einer 5 %igen wässrigen Chloramin T-Lösung.

Beide Komponenten wurden jeweils frisch gemischt.
Mit diesem Reagenz wurden die Platten bis zum Entstehen feuchter Flecke besprüht. Bei 150°C wurde das Reagenz in 5 bis 10 Minuten abgeraucht.
Dieses Verfahren wurde zur quantitativen Bestimmung eingesetzt. Um eventuell damit nicht erfaßbare kleine Glykosidmengen sowie weitere Substanzen zu detektieren, wurden in einigen Fällen zwei zusätzliche Sprühreagentien benutzt:

Xanthydrol-Reagenz nach PESEZ (1952)
zum Nachweis von 2-Desoxyzuckern
0,1 % Xanthydrol gelöst in Essigsäure/konz. HCl 1:3

RAYMOND-Reagenz (1938)
zum Nachweis der aktiven Methylengruppe im Lactonring
10 % m-Dinitrobenzol in Benzol und nach dem Trocknen
10 % methanolische NaOH.

Nähere Angaben zu Chromatographieverfahren, Rf-Werten und Fluoreszenzfarben sind der Dissertation BOY (1975) zu entnehmen.

c) Auswertung

Im Bereich von 0,5 bis 2,0 µg wurden die Flecke der Extrakte und der Referenzsubstanzen fluorimetrisch vermessen und der Cardenolidgehalt der Proben berechnet.
Dabei wurde die Summe aller wiedergefundenen und gemessenen Glykoside gleich 100 % gesetzt ohne Berücksichtigung der Molekulargewichtsunterschiede.

D Anlegen von Kulturen für Screening

Kenntnisse zur Biosynthese von Digitalis-Glykosiden bis hin zum Digitoxin wurden von TSCHESCHE (1971) zusammenfassend dargestellt. Die Biogenese 12ß-hydroxylierter Cardenolide konnte bis heute nicht restlos geklärt werden.
In Pflanzen der Species Digitalis lanata und einiger Unterarten entstehen aus Digitoxin und seinen Primärglykosiden nach TSCHESCHE et al. (1968 und 1970) Digoxin und seine glucosidierten und acetylierten Abkömmlinge.
Bei Beobachtung des Glykosidspektrums in zweijährigen Digitalis lanata - Pflanzen von der Keimung bis zur Samenreifung stellten WICHTL und FREIER (1976) fest, daß erst im September des zweiten Jahres Lanatosid A zu Lanatosid C hydroxyliert wurde.

Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit wurden Digitalis lanata - Pflanzen mit hohem Digoxingehalt eingesetzt. Es wurde angenommen, daß diese Pflanzen eine besonders hohe Aktivität an hydroxylierendem Enzymsystem aufweisen. Die größtmögliche Wahrscheinlichkeit zur Anzucht gut hydroxylierender Zellkulturen sollte durch Kallusbildung dieser Pflanzen erzielt werden.

1. Stationäre Kalluskulturen von Digitalis lanata

Nach den bei KOBLITZ (1972) zusammengestellten allgemeinen Methoden der Kulturtechnik wurden Kalluskulturen auf Agar von den unter C 1b genannten Pflanzen angelegt.
Zwischen Mitte und Ende April wurden von Blütentrieben mit 5 mm Durchmesser Stengelstücke abgenommen. Nach 5 Minuten Behandlung mit Aethanol 70 % wurden sie 5 bis 10 Minuten lang in wässriger Natriumhypochlorit-Lösung 2,5 % oberflächensterilisiert bis zur beginnenden Weißfärbung der Randzonen. Dreimal wurde mit sterilem Wasser abgespült. 2 mm dicke Scheibchen des Pflanzenmaterials wurden in kleinen Petrischalen ausgelegt. Deren Füllmenge betrug je 15 ml Nähragar NII mit Zusatz von 5 ppm 2,4-D.

In Kulturschränken wurden die Petrischalen bei einer Temperatur von 25 $\pm$ 2°C einer Dauerbeleuchtung von 2000 Lux ausgesetzt. Verwendet wurden Osram-L-Fluora 40W/77-Leuchtstoffröhren mit hohem blauen und roten Lichtanteil. Genaue Daten können der Dissertation von ALFERMANN (1973) entnommen werden.

Nach durchschnittlich 12 Tagen bildete sich farbloses Wundgewebe aus der Schnittfläche der Stengelstücke.
Das entstandene Gewebe wurde nach insgesamt 4 Wochen umgesetzt in 300 ml - Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nähragar. Der 28-Tage-Rhythmus wurde für die Weiterkultivierung beibehalten.

Es wurden Kalli von folgenden Pflanzen erhalten:

128	228	291 *	445
130 *	285 *	293 BHL *	447 *
216	287 *	347	508

Tab. 1 Zusammenstellung der auf NII-Agar gezogenen Kalli von Digitalis lanata Ehrh. ssp. lanata.
* Kallusbildung setzte bereits nach 6 Tagen ein.

Nach einigen Passagen hatten sich deutlich abweichende morphologische Merkmale der einzelnen Zellstämme ausgebildet:

Farbe	farblos, gelblich oder grün
Konsistenz	weich krümelig zerfallend oder feste Zellkonglomerate bildend (Durchmesser bis zu 10 mm)
Wachstum	sehr unterschiedlich
Regenerate-bildung	Wurzelbildung bei den Stämmen 364 und 23-17. Sproßregeneration bei Stamm 228, Pflanzen konnten im Gewächshaus herangezogen werden.

Analog wurden Kalluskulturen von Antheren des unter C 1c aufgeführten Pflanzenmaterials angelegt. Für den Nähragar wurde Medium G18 verwendet.

Folgende Kalluskulturen wurden erhalten:

Stamm	Digoxingehalt der Pflanze in %
9-14	0,41
10-2	0,49
22-6	0,40
23-17	0,30

Tab. 2 Zusammenstellung der auf G18-Agar gezogenen Kalli von Digitalis lanata Ehrh. ssp. leucophaea (Sibth. et Sm.) Werner.
Die Glykosidwerte der getrockneten Blätter wurden von Fa. Boehringer GmbH, Mannheim ermittelt.

2. Suspensionskulturen von Digitalis lanata - Zellstämmen

Nach sechs Kulturpassagen von je 28 Tagen wurden 5 g Kallus in 25 ml Nährlösung pro Kolben eingewogen und auf Rundschüttelmaschinen weiterkultiviert. Für jeden Stamm wurde zunächst das als Agar verwendete Nährmedium beibehalten.

Zur bereits erwähnten Umstellung von Zellkulturen aus NII- auf das definierte G18-Medium wurde sowohl Gewebe von NII-Agar als auch Zellmasse bereits adaptierter NII-Schüttelkulturen in flüssige G18-Nährlösung eingeimpft. Jedoch konnte dort nicht mit allen Zellstämmen eine gut wachsende Kultur erzielt werden.

Leicht zerfallendes Kallusgewebe adaptierte sich schneller an das flüssige Medium und zeigte bald gutes Wachstum in der Schüttelkultur. Zellstämme, die auf Agar in festen Brocken bis zu 10 mm Durchmesser gewachsen waren, bereiteten gewisse Schwierigkeiten bei der Umstellung in die flüssige Nährlösung.

Nachdem von allen eingesetzten Pflanzen gut eingestellte Zellkulturen mindestens sechs Monate lang in Suspension vorlagen , wurde mit der Untersuchung auf Umwandlungsreaktionen begonnen.
In diesem Zusammenhang soll kurz hingewiesen werden auf das Vorkommen von Cardenoliden in Zellkulturen von Digitalis lanata. Neueste Untersuchungen stammen von KARTNIG (1977). In stationären Kulturen konnten bis zur 11. Passage Cardenolide in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dabei lieferten verschiedene Kalli desselben Pflanzenmaterials unterschiedliche Glykosidmuster. Nach längerer Kulturdauer ging die Fähigkeit zur Cardenolidsynthese verloren oder wurde reprimiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Glykoside in der durch oben beschriebene Detektion und Meßanordnung festgelegten Größenordnung nicht gefunden.

E Vorversuche

Erste Umwandlungsversuche wurden mit Digitalis lanata - Zellstämmen durchgeführt, die zwei Jahre lang als Schüttelkulturen im Arbeitskreis vorlagen.
In folgenden Punkten sollten Hinweise auf die günstigste Versuchsanordnung für ein späteres Screening erarbeitet werden:

Einfluß von Licht auf die Umwandlung

Wahl des geeignetesten Substrates

Bedeutung des Wachstumszustandes der Kultur für das Biotransformationsverhalten

Als Substrate wurden angeboten:

Lanatosid A	- genuin in Digitalis lanata - Pflanzen
Digitoxin	- entsteht bei der Aufarbeitung
ß-Methyldigitoxin	- siehe BOY (1975)

1. Dunkelstamm E

Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Im Dauerdunkel wurde Gewebe in achtwöchigen Passagen in flüssigem NII-Medium kultiviert.
Die leicht zerfallenden Zellaggregate waren farblos bis hellbeige. Die Kultur wies eine sehr geringe Wachstumsrate auf.

Abb. 2 zeigt, daß 6 Tage nach Zugabe des Substrates bereits 49 % hydroxyliert waren. Gleichzeitig wurden 6 % Purpureaglykosid A gebildet, das jedoch bis zum Versuchsende wieder vollständig verschwand. Nach 27 Tagen lagen 100 % ß-Methyldigoxin vor.
Gewebewachstum war während des Versuches kaum zu verzeichnen.

2. Lichtstamm E

Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Diese Kulturen stammten ursprünglich von demselben Kallus des Zellstammes E wie die Dunkelkultur, waren aber zwei Jahre lang mit 2000 Lux auf der Schüttelmaschine beleuchtet worden. Das Gewebe war von kräftig grüner Farbe und zeichnete sich durch gutes Wachstum aus. Die Kulturpassage betrug 21 Tage.

Nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin, dargestellt in Abb. 3, setzte schnell Hydroxylierung ein und erreichte mit 73 % ß-Methyldigoxin in 12 Tagen ein Maximum. Im gleichen Zeitraum wurden 26 % des Substrates zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert.

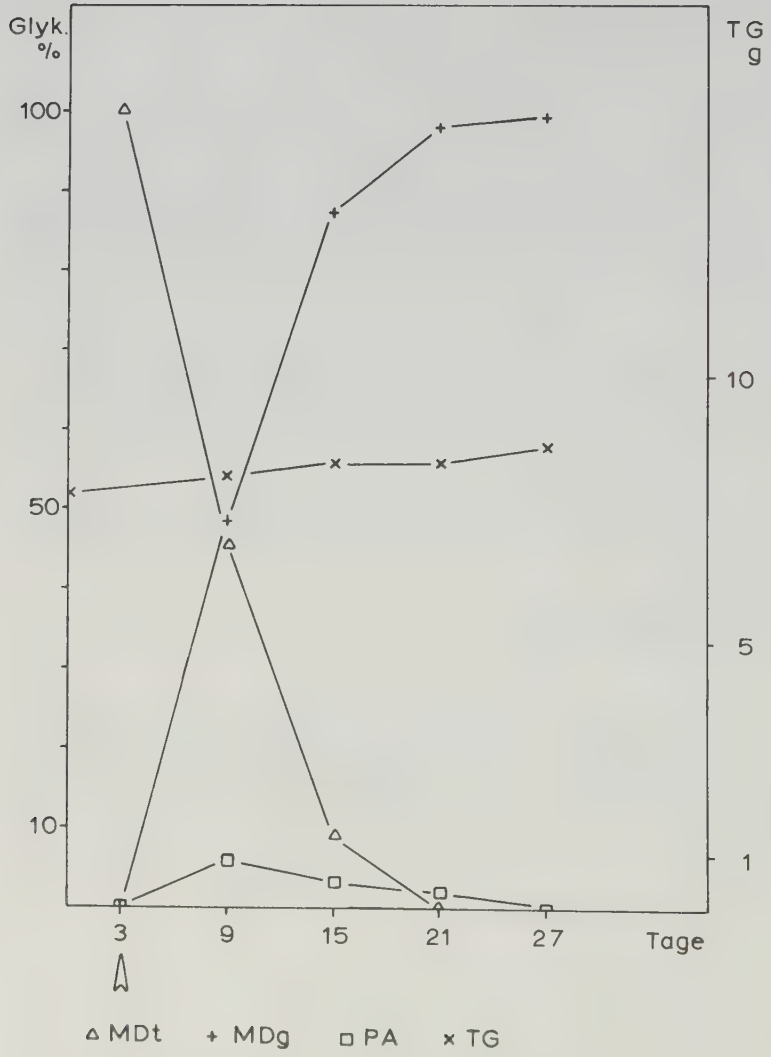


Abb. 2 Dunkelstamm E in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

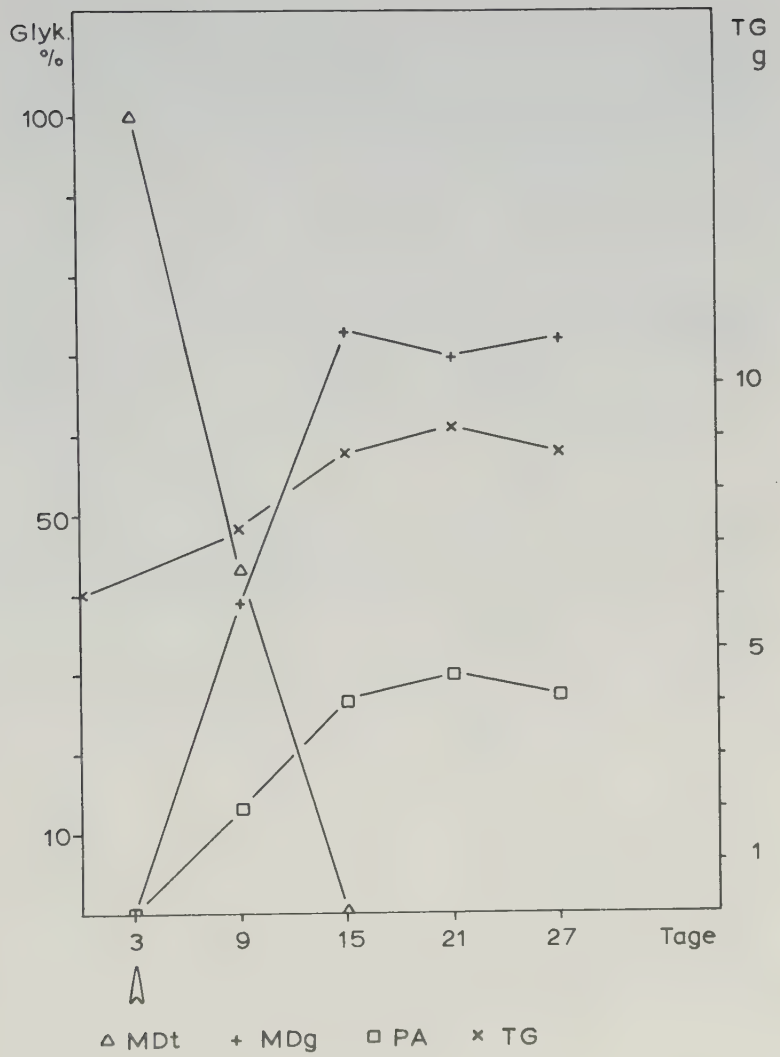


Abb. 3 Lichtstamm E in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Abb. 4 zeigt den Reaktionsverlauf der Umwandlung von ß-Methyldigitoxin durch Dunkel- und Lichtkulturen des Zellstammes E. Durch 12ß-Hydroxylierung entstand ß-Methyldigoxin, durch Abspaltung der Methylgruppe und Glucosidierung an dieser Stelle wurde Purpureaglykosid A gebildet.

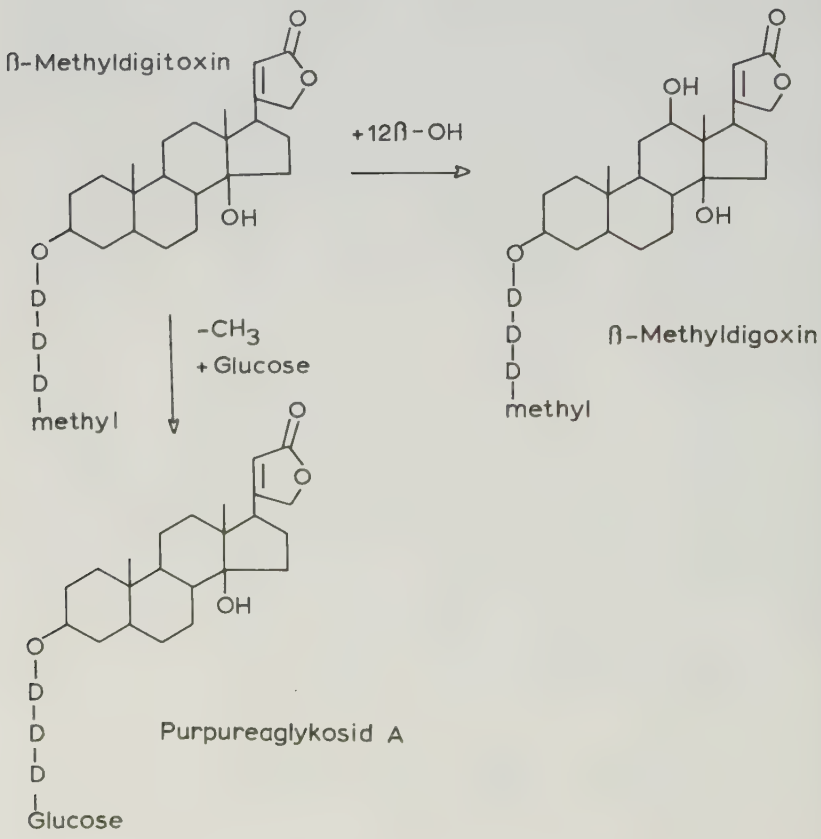


Abb. 4 ß-Methyldigitoxin wird hydroxyliert zu ß-Methyldigoxin, demethyliert und glucosidiert zu Purpureaglykosid A.

Eine Gleichgewichtsverschiebung im Reaktionsverlauf ist festzustellen bei Vergleich von Dunkelstamm E (Abb. 2) und Lichtstamm E (Abb. 3). Während bei Inkubation der Dunkelkulturen nur vorübergehend geringe Mengen des glucosidierten Umwandlungsproduktes auftraten und eine nahezu vollständige Hydroxylierung ablief, wurde bei der Untersuchung der Lichtkulturen die Hydroxylierungsrate durch gleichzeitige intensivere Demethylierung und Glucosidierung gesenkt. Bedingt durch die Zufuhr von Licht stand offensichtlich die im Nährmedium freigesetzte Glucose in größerem Anteil zur Glucosidierungsreaktion zur Verfügung.

Der folgende Versuch sollte klären, ob die Glucosidierung unterdrückt werden könnte durch Dunkelinkubation des Lichtstammes während der Versuchsdauer.

3. Lichtstamm E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin im Dauerdunkel

Nach der Substratzugabe wurden die Schüttelkolben in Dauerdunkel gesetzt. Abb. 5 stellt dar, daß die Glucosidierung die Hauptreaktion war. Innerhalb von 12 Tagen waren 50 % Purpureaglykosid A entstanden. Langsamer verlief die Hydroxylierung. 40 % ß-Methyldigoxin konnten bei Versuchsende identifiziert werden. Als Nebenprodukt trat Lanatosid A auf. Die Acetylierung setzte 6 Tage nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin ein und erreichte einen Anteil von 10 %. Da die Kurve der Purpureaglykosid A - Konzentration am 15. Tag einen deutlichen Knick aufweist, erfolgte der Acetylierungsschritt vermutlich erst im Anschluß an die Glucosidierung.

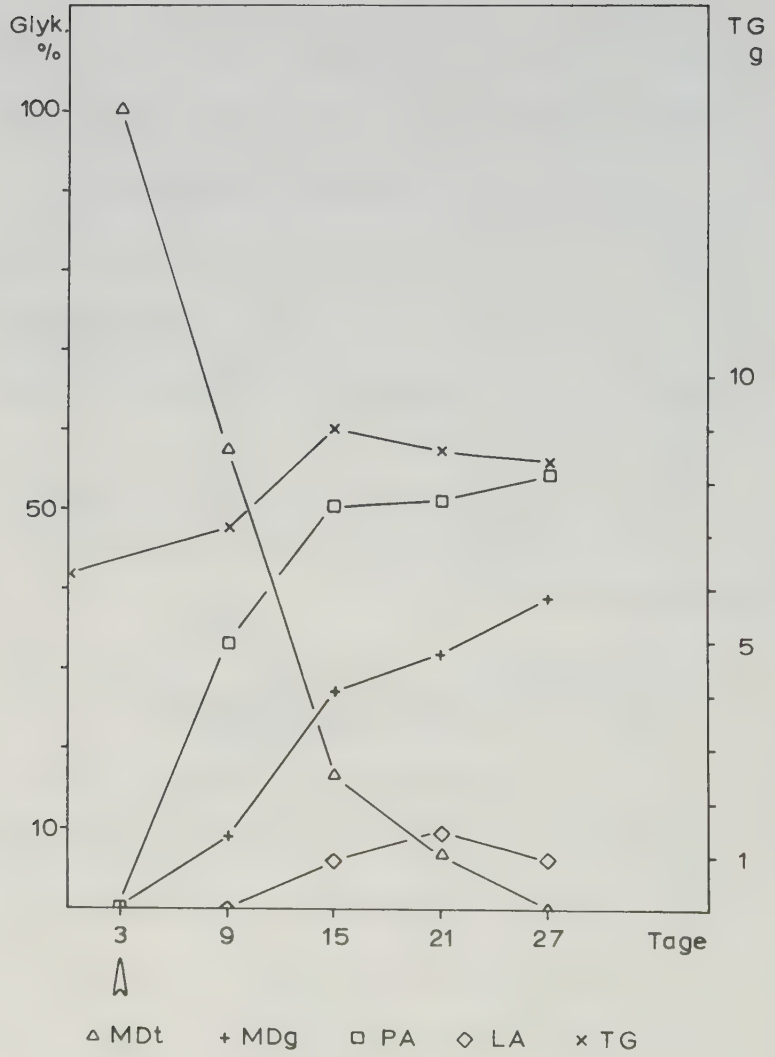


Abb. 5 Lichtstamm E in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin im Dauerdunkel

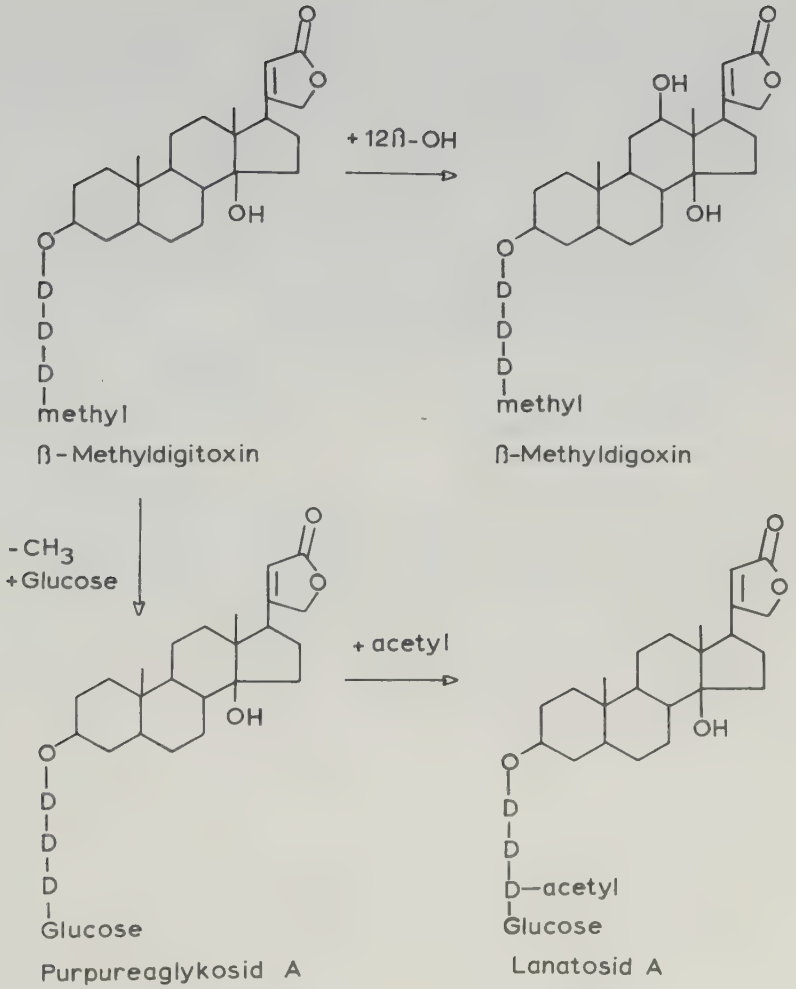


Abb. 6 ß-Methyldigitoxin wird hydroxyliert, demethyliert und glucosidiert, demethyliert, glucosidiert und acetyliert.

Durch die Dunkelinkubation des Lichtstammes E konnte der Versuchsverlauf nicht in die gewünschte Richtung gesteuert werden. Es wurde keine Steigerung der Hydroxylierungsrate erzielt; vermehrt gebildet wurden statt dessen Primärglykoside.

Der folgende Versuch sollte klären, nach welchem Reaktionsschema das genuine Primärglykosid Lanatosid A bei Zugabe zu Zellkulturen des Stammes E verändert würde.

4. Lichtstamm E
   Zugabe von Lanatosid A

Erst nach einer Versuchsdauer von 14 Tagen erfuhr das Substrat Veränderungen. Eine Hydroxylierungsreaktion zu Lanatosid C erreichte nach 21 Tagen einen Endwert von 21 %. Durch Desacetylierung entstanden in diesem Zeitraum 12 % Purpureaglykosid A. Das Rest-Substrat blieb unverändert.
Abb. 7 gibt den Reaktionsverlauf wieder.

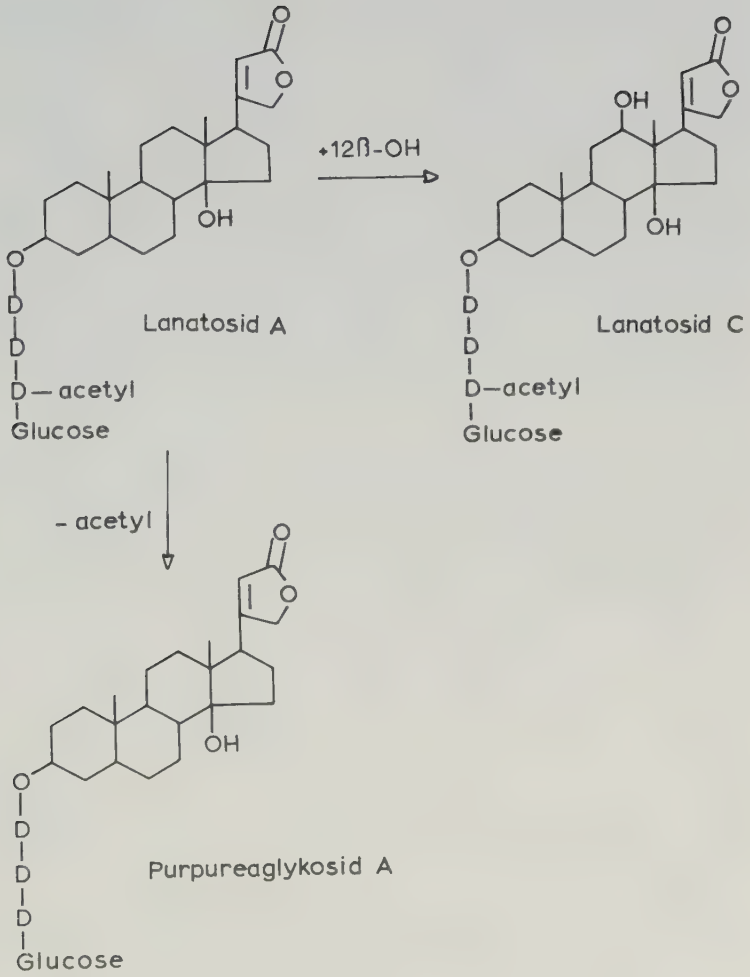


Abb. 7 Lanatosid A wird hydroxyliert zu Lanatosid C und desacetyliert zu Purpureaglykosid A.

5. Lichtstamm B2
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

In vierwöchigen Passagen wurde dieser Zellstamm in flüssigem G18-Nährmedium kultiviert.
Nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin wurden nach kurzer Anlaufzeit, wie in Abb. 8 dargestellt, 98 % umgewandelt. Über 6 Tage war nur eine langsame Glucosidierung festzustellen. Dann trat rasche Hydroxylierung ein, die einen Endwert von 90 % ß-Methyldigoxin erreichte. Der Anteil an Purpureaglykosid A betrug 8 %. Die Umwandlung verlief somit nach dem Reaktionsschema Abb. 4.

Mit dieser Zellkultur wurde die Biotransformation des unsubstituierten Digitoxins untersucht.

6. Lichtstamm B2
Zugabe von Digitoxin

3 Tage nach Substratzugabe konnte im Kulturfiltrat kein Cardenolid nachgewiesen werden. In der Gewebefraktion wurden Purpureaglykosid A und Lanatosid A bestimmt. Durch Glucosidierung waren 90 % Purpureaglykosid A entstanden, durch Glucosidierung mit gleichzeitiger oder anschließender Acetylierung Lanatosid A.

Abb. 9 zeigt schematisch den Reaktionsverlauf dieses Versuches. Die Glucosidierung verlief nach Zugabe unsubstituierten Digitoxins wesentlich schneller als bei ß-Methyldigitoxin, wo zunächst die Methylgruppe abgespalten werden muß, die die Glucose-Bindungsstelle im Digitoxin-Molekül blockiert.

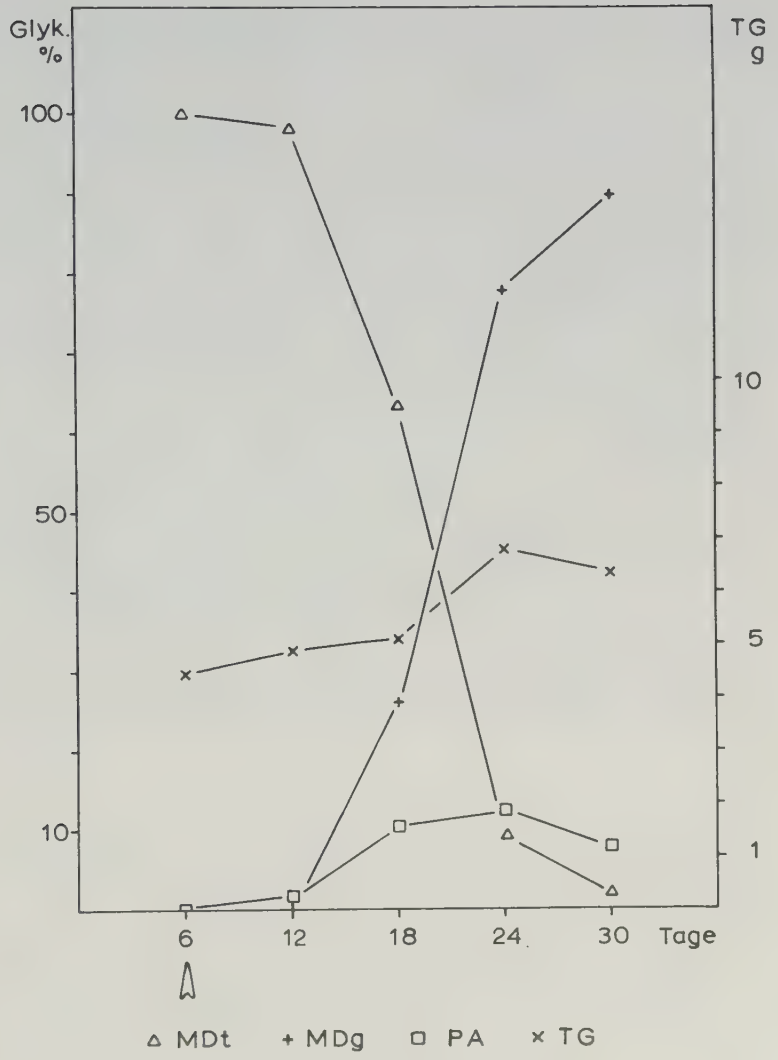


Abb. 8 Zellstamm B2 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

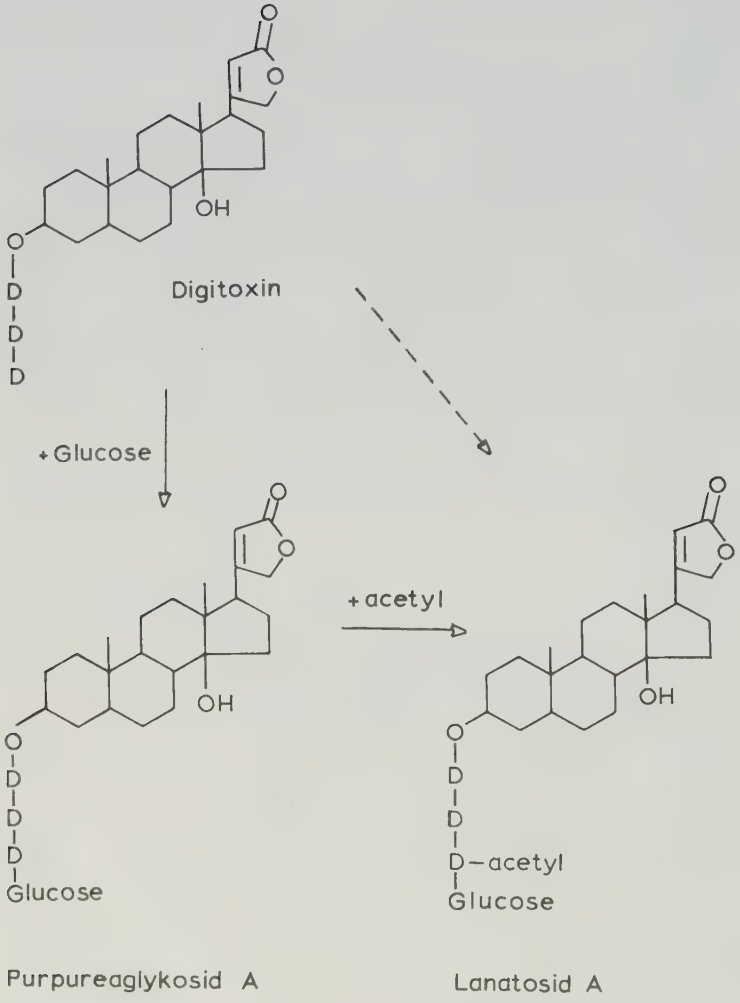


Abb. 9 Reaktionsschema bei der Umwandlung von Digitoxin nach Zugabe zu Schüttelkulturen des Stammes B2.

7. Lichtstamm 364
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Feste Zellaggregate bis zu einer Größe von 10 mm Durchmesser lagen von Zellstamm 364 in G18-Nährlösung vor.
Abb. 4 ist das Reaktionsschema für den Verlauf dieses Versuches. Eine Substratveränderung erfolgte gleichermaßen durch Demethylierung und Glucosidierung sowie durch Hydroxylierung. Purpureaglykosid A trat nach Abb. 10 innerhalb von 6 Tagen zu 20 % auf und erreichte bei Versuchsende 30 %. Hydroxyliert waren zu diesem Zeitpunkt 36 % der gesamten Glykoside als ß-Methyldigoxin. In der Gewebefraktion wurden 33 % unverändertes ß-Methyldigitoxin wiedergefunden.

8. Lichtstamm 364
Zugabe von Digitoxin

Glucosidierung war die einzige beobachtete Veränderung des zugesetzten Substrates:

Digitoxin $\xrightarrow{+\text{Glucose}}$ Purpureaglykosid A

Nach 3 Tagen lagen 60 % Purpureaglykosid A vor, nach weiteren 3 Tagen wurden 74 % gemessen. Der Rest des Digitoxins wurde im Verlauf des Versuches nicht mehr verändert.

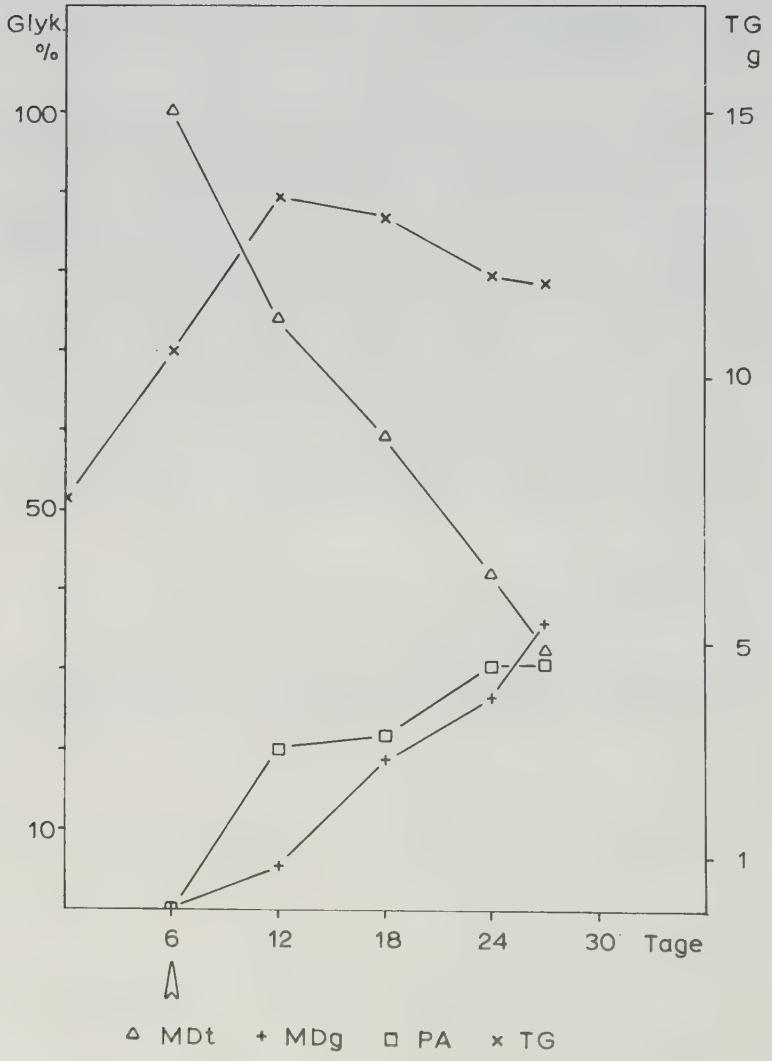


Abb. 10 Zellstamm 364 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

9. Diskussion der Vorversuche

Bei Dunkelstamm E wurde eine bessere Hydroxylierungsrate als bei dem entsprechenden Lichtstamm beobachtet. Analoges berichtete BOY (1975) für den Zellstamm 72.
Eine Umstellung auf Arbeiten mit Dunkelkulturen erschien jedoch wegen des unzulänglichen Gewebewachstums nicht sinnvoll. Vor allem in Hinblick auf die späteren Fermentationsversuche mußte eine zufriedenstellende Wachstumsrate unbedingt gefordert werden.
Inkubation im Dauerdunkel während der Umwandlung konnte den Reaktionsverlauf nicht zugunsten der 12ß-Hydroxylierung verschieben. Sichere Schlußfolgerungen zum Einfluß von Licht auf das Biotransformationsverhalten von Zellkulturen konnten aus der vergleichenden Betrachtung dieser Vorversuche nicht gezogen werden.
Die Zellstämme für das folgende Screening wurden deshalb ohne besondere Beleuchtung in Suspension weiterkultiviert, unter anderem aus der Überlegung, daß in Bioreaktoren größerer Volumina eine Beleuchtung kaum möglich ist.

Lanatosid A wurde zwar durch Zellkulturen des Stammes E zu Lanatosid C hydroxyliert, aber nur in geringen Mengen und nach längerer Versuchsdauer. An Digitoxin wurde bei den Stämmen B2 und 364 keine Hydroxylierung festgestellt.
Bei der Verwendung von ß-Methyldigitoxin als Substrat wurde mit allen drei Zellstämmen Hydroxylierung erzielt.
Stamm B2 zeigte eine fast 100 %ige Hydroxylierungsrate mit nur geringen Mengen Purpureaglykosid A als Nebenprodukt.

Die Einführung der Methylgruppe an C-4 der endständigen Digitoxose (siehe Abb. 1) beeinflußt die Veränderung von Cardenoliden durch Zellkulturen wesentlich. Die Glucose-Bindungsstelle ist blockiert. Die bei Digitoxin sehr schnell eintretende Glucosidierung - von BOY (1975) innerhalb von Stunden beobachtet - wird verzögert. Dadurch wird die 12ß-Hydroxylierung begünstigt.
Für ß-Methyldigitoxin als Substrat spricht zudem die zunehmende therapeutische Verwendung partialsynthetischer Digoxinderivate. Aus dieser Umwandlungsreaktion resultiert unmittelbar das für Arzneispezialitäten verwendete ß-Methyldigoxin.

In den bisherigen Versuchen ist neben der Glykosidverteilung die Gewebezuwachsrate bestimmt worden. Der Anstieg der Trockengewichte ist den Abbildungen zu entnehmen. Es sollte entschieden werden, ob die Hydroxylierung bevorzugt in einer bestimmten Wachstumsphase der Kultur stattfindet.
BOY (1975) hatte die stärkste Hydroxylierung nach beendetem Wachstum festgestellt. Dies bestätigte sich in diesen Vorversuchen nicht. Der steilste Anstieg von ß-Methyldigoxin lag bei den in den Abb. 3, 5 und 8 dargestellten Versuchen jeweils im Bereich der Wachstumsphase.

Aus diesem Grund wurde die Substratzugabe in den folgenden Versuchen dieser Arbeit während normaler Kulturpassagen durchgeführt. Somit ergaben sich durch unterschiedliche Passagendauer der Zellstämme entsprechend voneinander abweichende Versuchslängen.

F Screening

Stamm	Medium	Kulturpass. Tage	Zellaggr. Durchm. mm	Farbe
72	G18	28	1-2	gelbgrün
128	NII	21	1	blaßgrün
130	NII	21	3-4	hellgrün
216	NII	21	1-3	farblos
228	NII	14	3-4	blaßgelb
285	NII	21	2	gelbgrün
287	NII	21	2-3	hellbeige
287	G18	14	2	gelbgrün
291	NII	21	2	blaßgrün
291	G18	14	1	int. grün
293	G18	14	2-3	blaßgelb
293BHL	NII	21	1	farblos
347	NII	21	1	gelbgrün
445	NII	14	2-3	farblos
447	NII	21	1-2	farblos
508	NII	21	3-4	hellgrün
9-14	G18	14	2-3	blaßgrün
10-2	G18	14	1-3	hellgrün
22-6	G18*	14	2	gelbgrün
23-17	G18*	21	1-2	gelblich
E	G18	14	1	gelbgrün
E	NII	21	1-2	gelbgrün

Tab. 3 Zusammenstellung der unter Standardbedingungen auf Biotransformationsverhalten untersuchten Zellstämme.
* Zusatz von 2 ppm 2,4-D

Nach den beschriebenen Standard-Versuchsbedingungen wurden die in Tab. 3 zusammengestellten Zellkulturstämme auf ihr Biotransformationsverhalten nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin untersucht. Die Tabelle enthält Angaben zu dem verwendeten Nährmedium, zur Kulturpassagendauer sowie zum morphologischen Erscheinungsbild der Zellstämme.
Der von BOY (1975) untersuchte Digitalis lanata - Zellstamm 72L lag in wenig veränderter Form weiterhin vor, wurde jedoch 2 Jahre lang in G18-Nährlösung kultiviert. Durch Überimpfen von Zellaggregaten mit maximal 1-2 mm Durchmesser war eine feine Suspensionskultur entstanden. Die Untersuchung dieses Zellstammes war Ausgangspunkt für das anschließende Screening.

Zellstamm 72

Der in Abb. 11 dargestellte Umwandlungsversuch zeigt, daß nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin Hydroxylierung und Glucosidierung 18 Tage lang nahezu parallel verliefen. Die Bildung von Purpureaglykosid A war mit 34 % abgeschlossen. Das restliche Substrat wurde vollständig hydroxyliert. Am 33. Tag des Versuches lagen 65 % der Glykoside als ß-Methyldigoxin vor.

Zellstamm 128

Abb. 12 zeigt: das zugesetzte ß-Methyldigitoxin wurde zu 83 % zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert. Am 15. Versuchstag lagen beide Substanzen in der Gewebefraktion vor. Spuren von Digitoxin wurden dort gefunden.

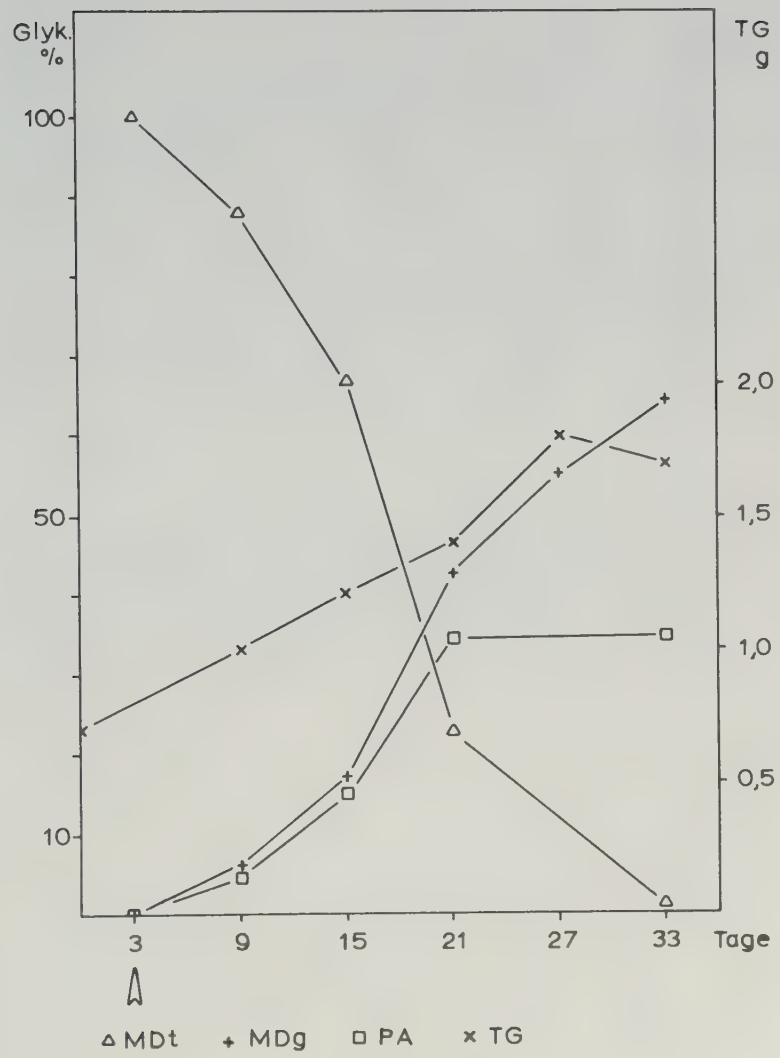


Abb. 11 Zellstamm 72 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

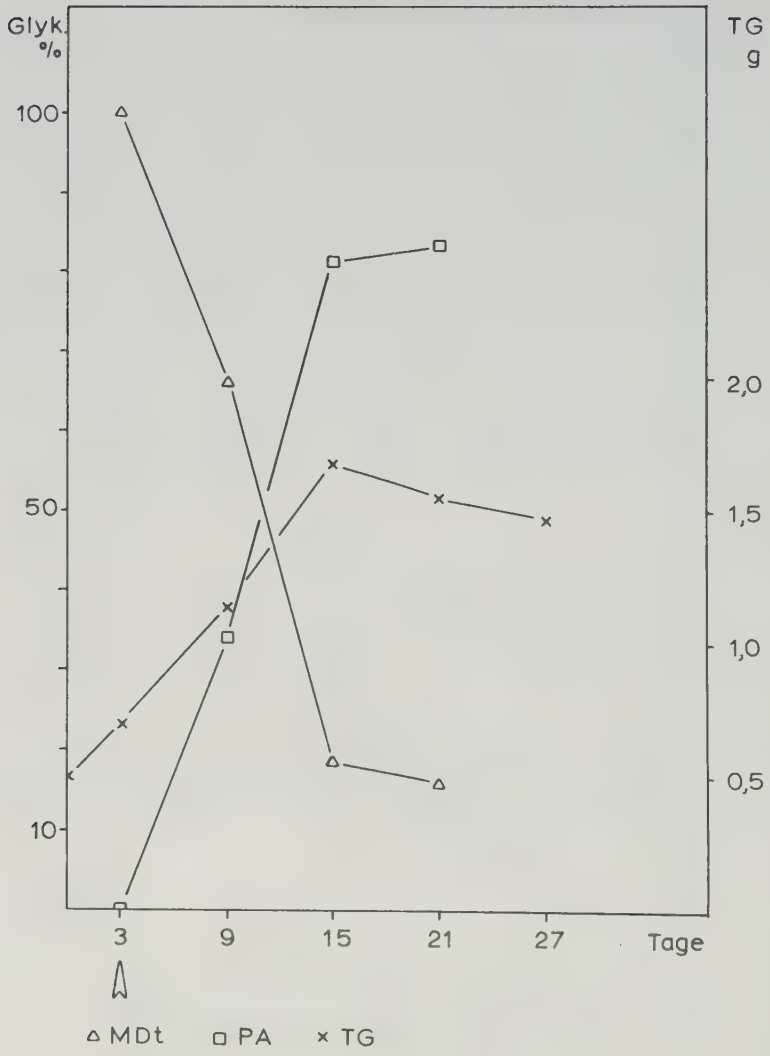


Abb. 12 Zellstamm 128 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 130

Abb. 13: Zellkulturen des Stammes 130 zeigten ein gleichmäßiges Wachstum und parallel dazu eine langsam ansteigende Umwandlung des zugesetzten ß-Methyldigitoxins zu Purpureaglykosid A.
50 % des Substrates wurden während einer Versuchsdauer von 33 Tagen demethyliert und glucosidiert. Sowohl das Umwandlungsprodukt als auch das restliche Substrat lagen im Extrakt der Gewebefraktion vor.

Zellstamm 216

Nach Inkubation von Kulturen dieses Zellstammes mit ß-Methyldigitoxin wurden nur geringe Mengen Purpureaglykosid A als Umwandlungsprodukt nachgewiesen. Das Substrat lag nach 27 Tagen nahezu vollständig unverändert vor. Dabei ließ sich deutlich eine Aufnahme aus dem Kulturfiltrat in die Gewebefraktion verfolgen.
Das Trockengewicht der Zellmasse verdreifachte sich innerhalb von 15 Tagen.

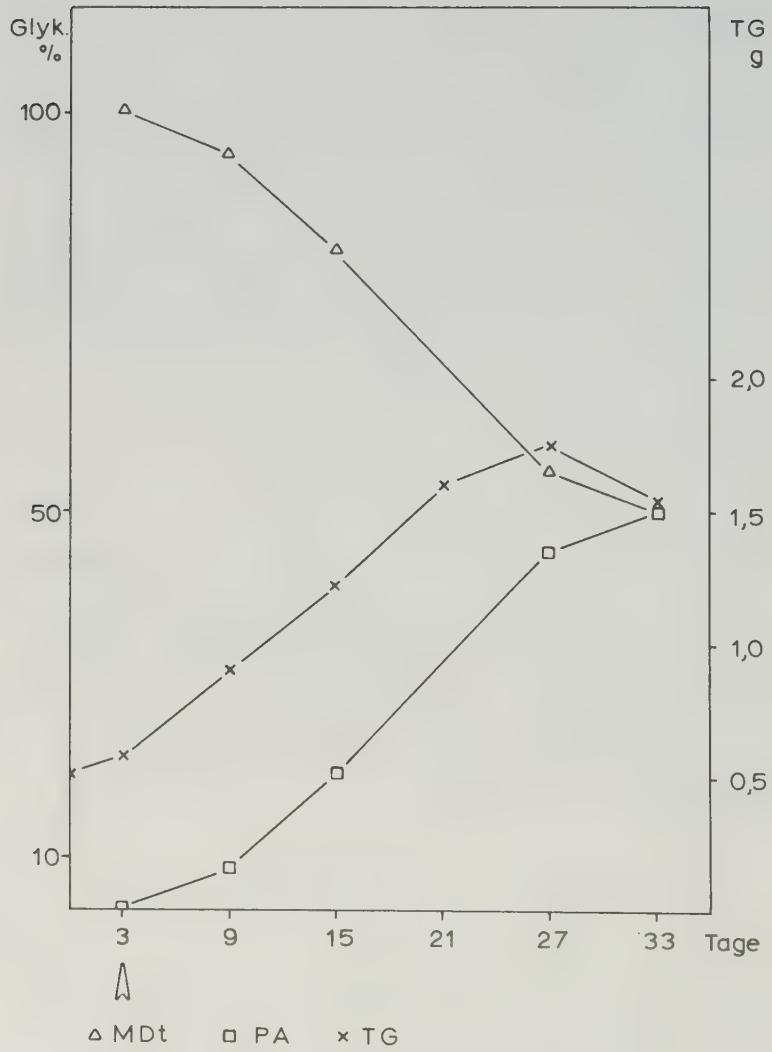


Abb. 13 Zellstamm 130 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 228

Dieser Zellstamm fiel durch sehr starkes Wachstum auf: in 21 Tagen vervierfachte sich das Trockengewicht. Abb. 14 gibt den Versuchsverlauf nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin wieder. Bildung von Purpureaglykosid A setzte sofort ein. Am 15. Versuchstag wurden 26 % dieses Glykosids gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Zugabe von ß-Methyldigitoxin eine ausgeprägte Zellwachstumsbeeinträchtigung darstellte. Das Wachstum der Kultur während der Inkubation mit Glykosid stagnierte. Zell-Lyse trat jedoch nicht ein.
Parallel zu den Trockengewichtswerten aus dem Umwandlungsversuch sind in Abb. 14 Wachstumskontrollwerte unbehandelter Kulturen aufgetragen.

Kulturen des Zellstammes 228 zeigten somit eine äußerst geringe Belastbarkeit gegenüber zugesetztem Cardenolid. Zur näheren Untersuchung wurde geprüft, wo ß-Methyldigitoxin nach der Zugabe auftrat.
Abb. 12 veranschaulicht, daß innerhalb von 3 Stunden 20 % in die Gewebefraktion aufgenommen waren. Nach 3 Tagen lagen dort 35 % vor. Dieser Anteil wurde bis zum Versuchsende nicht mehr in Umwandlungsreaktionen einbezogen. Von den nach 3 Stunden im Kulturfiltrat aufgetretenen 79 % ß-Methyldigitoxin wurden zunehmende Anteile zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert. 9 Tage nach begonnener Umwandlung trat das Reaktionsprodukt dann nicht nur wie bis dahin in der Gewebefraktion, sondern auch im Kulturfiltrat auf. Das restliche Substrat war fast gleichmäßig verteilt auf beide Extrakte.

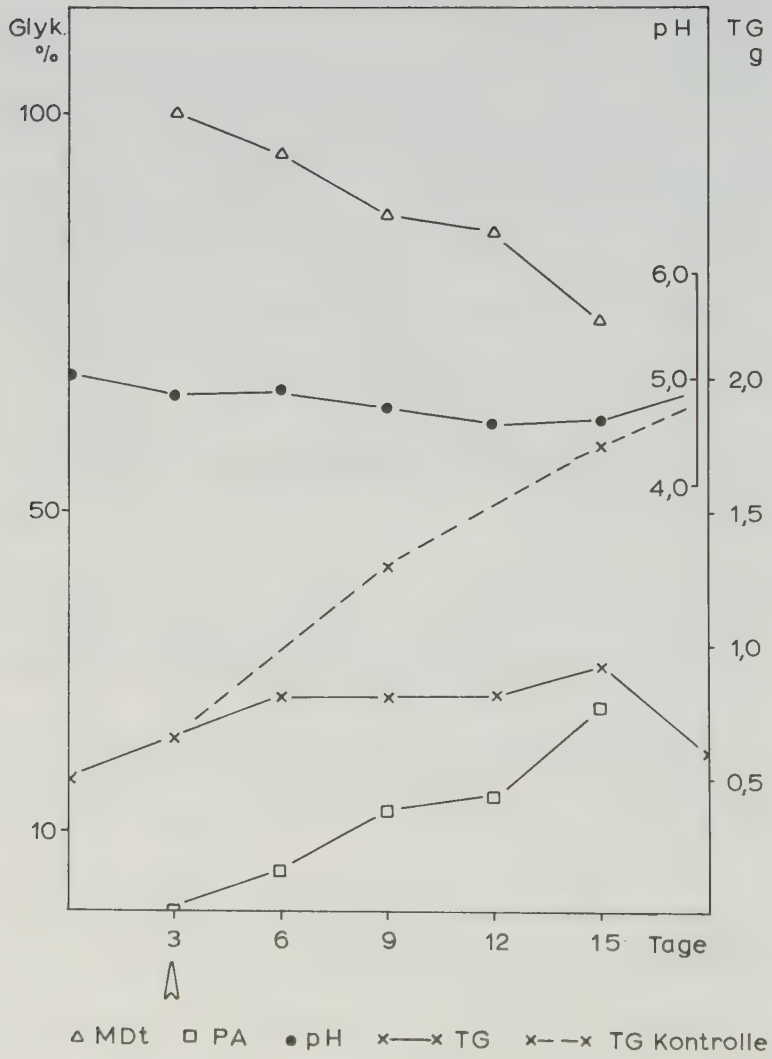


Abb. 14 Zellstamm 228 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

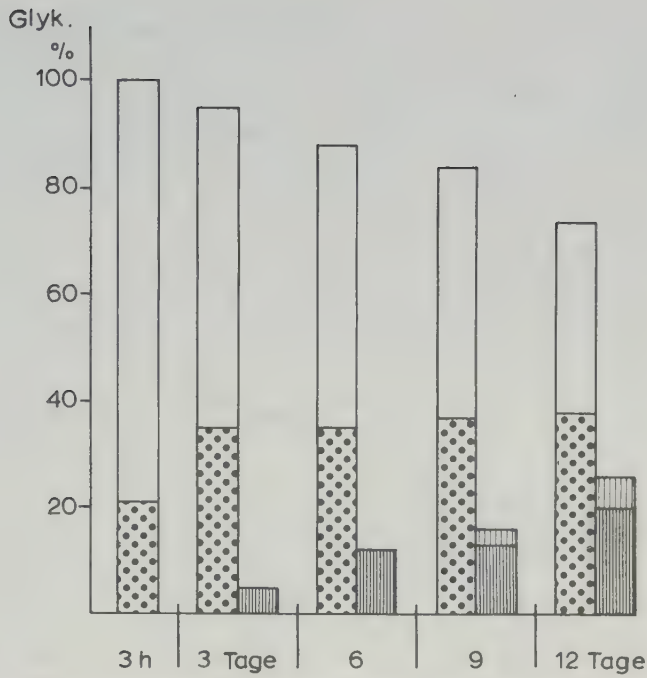


Abb. 15 Glykosidverteilung in Gewebe und Kulturfiltrat von Zellkulturen des Stammes 228 nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin. MDt im Kulturfiltrat, MDt im Gewebe, PA im Kulturfiltrat, PA im Gewebe.

Zellstamm 285

Abb. 16: zugesetztes ß-Methyldigitoxin wurde innerhalb von 6 Tagen zu 72 % hydroxyliert zu ß-Methyldigoxin. Nach einer Gesamtinkubationsdauer von 12 Tagen lag - außer einer Spur Purpureaglykosid A im Gewebe - ß-Methyldigoxin als einziges Glykosid vor. Der Hauptanteil wurde im Kulturfiltrat gemessen, nur 15 % anteilig in der Gewebefraktion.

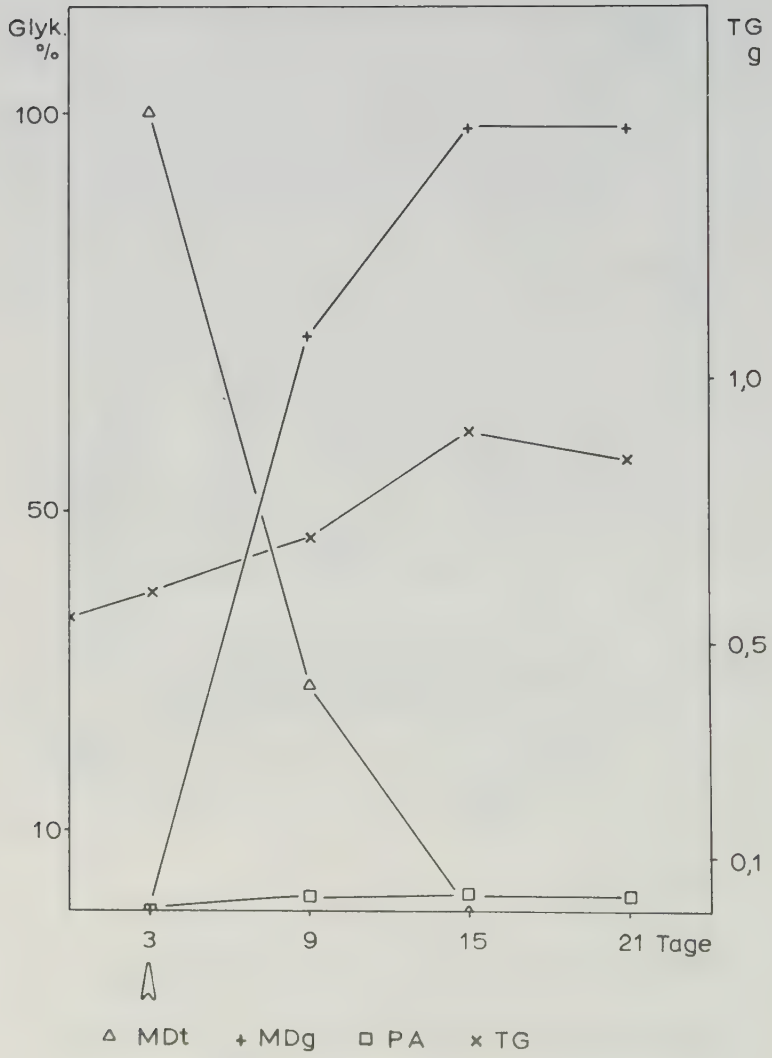


Abb. 16 Zellstamm 285 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 287 in NII-Nährmedium

Wie in Abb. 17 wiedergegeben, setzten nach Substratzugabe gleichzeitig Hydroxylierung und Glucosidierung ein. Nach 18 Tagen war ein Maximum von 26 % Purpureaglykosid A erreicht. Die Hydroxylierung lief weiter. ß-Methyldigoxin stieg bis zu einem Anteil von 52 % der Gesamtglykoside an. Das unveränderte Restsubstrat erschien gleichmäßig verteilt auf Gewebefraktion und Kulturfiltrat.

Zellstamm 287 in G18-Nährmedium

Abb. 18 zeigt deutliche Abweichungen des Versuchsverlaufes nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin zu Kulturen des Stammes 287 in diesem Nährmedium, verglichen mit Abb. 17.

Innerhalb von 3 Tagen war das Substrat vollständig zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert. Anschließend wurden geringe Mengen dieses Umwandlungsproduktes demethyliert und glucosidiert. So lagen bei Versuchsabbruch 10 % als Deslanosid C in der Gewebefraktion vor.

In diesem Versuch konnte eine 100 %ige 12ß-Hydroxylierung nachgewiesen werden. Dieser Zellstamm 287 hatte in NII-Nährlösung nur eine Umwandlungsrate von 64 % erzielt, davon 52 % Anteil an 12ß-Hydroxylierung.

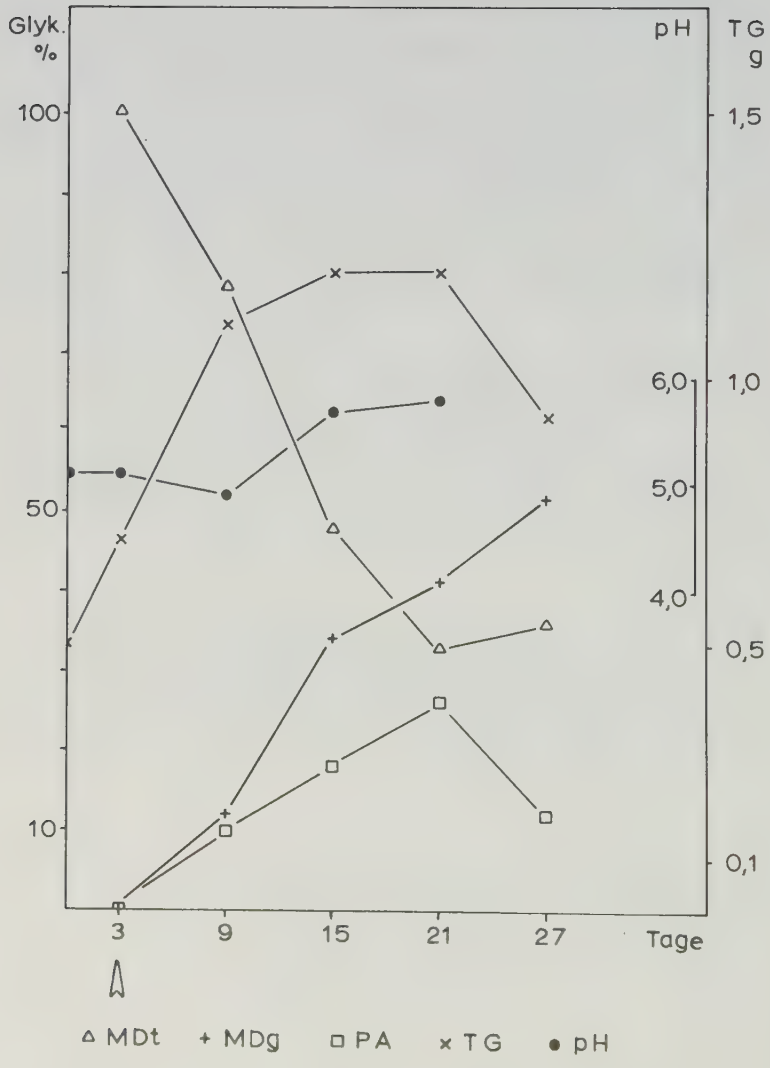


Abb. 17 Zellstamm 287 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

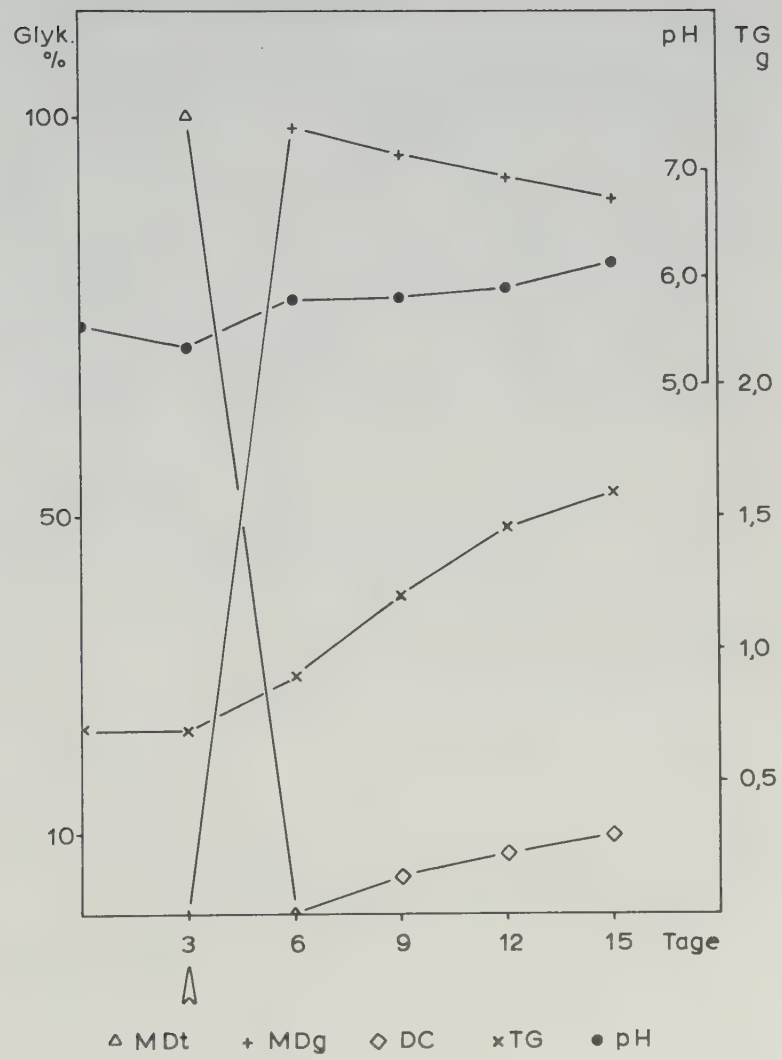


Abb. 18 Zellstamm 287 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Nach der innerhalb von 3 Tagen beendeten 12ß-Hydroxylierung des Substrates zu ß-Methyldigoxin wurde durch Zellkulturen des Stammes 287 in G18-Nährlösung die Methylgruppe abgespalten und dort Glucose gebunden:

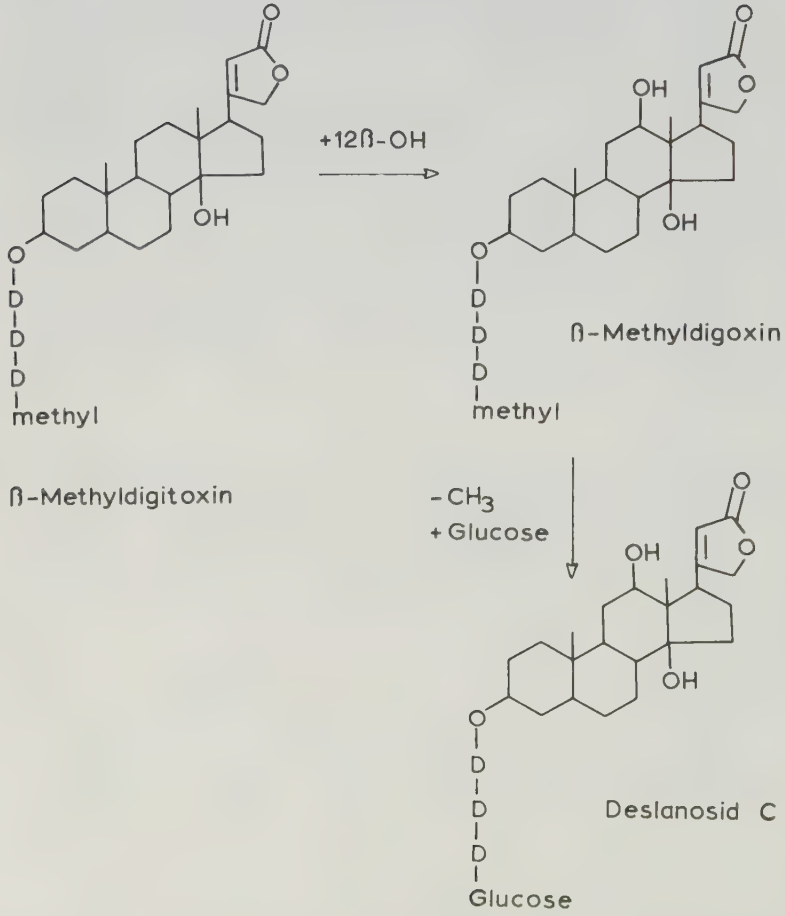


Abb. 19 ß-Methyldigitoxin wird zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert. ß-Methyldigoxin wird teilweise demethyliert und glucosidiert zu Deslanosid C.

Zellstamm 291 in NII-Nährmedium

Abb. 20 zeigt die Inkubation dieser Schüttelkulturen mit ß-Methyldigitoxin. 6 Tage nach Zugabe war das Substrat nur noch in Spuren nachzuweisen. Das extrahierte Glykosidgemisch bestand zu 65 % aus ß-Methyldigoxin, zu 29 % aus Purpureaglykosid A und zu 7 % aus Deslanosid C. Anschließend ging der Anteil an glucosidierten Substanzen wieder zurück. Am 27. Versuchstag war nur ß-Methyldigoxin meßbar. Es lag eine 100 %ige Hydroxylierung vor.
Mit dem Rückgang des Trockengewichtes und dem Verschwinden der zunächst gebildeten Primärglykoside Purpureaglykosid A und Deslanosid C sank die Gesamtwiederfindungsrate. Bei Versuchsende betrug die gemessene Glykosidmenge nur noch 25 % bezogen auf das zugesetzte Substrat.

Eine Umwandlung der Primärglykoside zu ß-Methyldigoxin zwischen dem 15. und dem 27. Tag des Versuches (Abb. 20) würde bedeuten, daß die Zellkultur nach Abspaltung der Glucose erneut die Methylgruppe an dieser Stelle einführen könnte. Es erscheint jedoch fraglich, ob pflanzlichen Zellen dieser Reaktionsschritt möglich ist.
Andererseits läßt das Absinken der Wiederfindungsrate auf einen Cardenolidabbau schließen. Der Verlauf dieses Versuches ist der einzige Hinweis in dieser Richtung, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Sollten glucosidierte Cardenolide gegenüber methylierten Derivaten einem verstärkten oder beschleunigten Abbau unterworfen sein, wäre eine Möglichkeit gegeben, den erneuten Anstieg der ß-Methyldigoxin - Konzentration nach dem 15. Tag zu erklären. Statt 100 % Hydroxylierungsrate lägen somit jedoch nur 65 % vor.

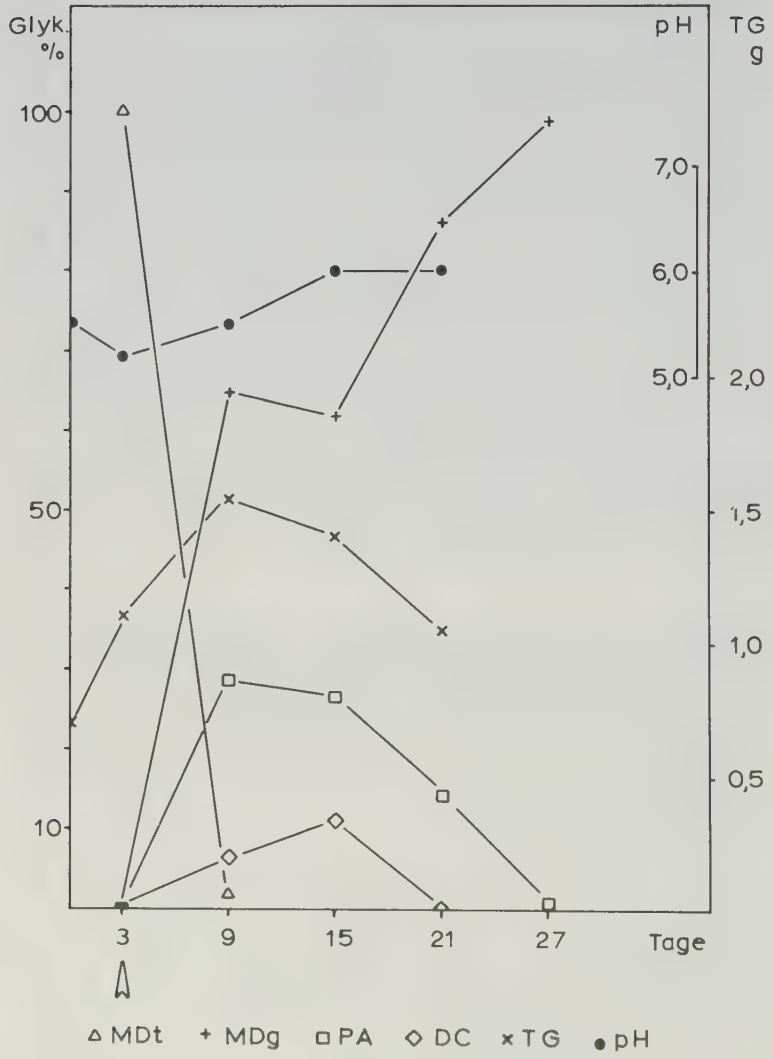


Abb. 20 Zellstamm 291 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

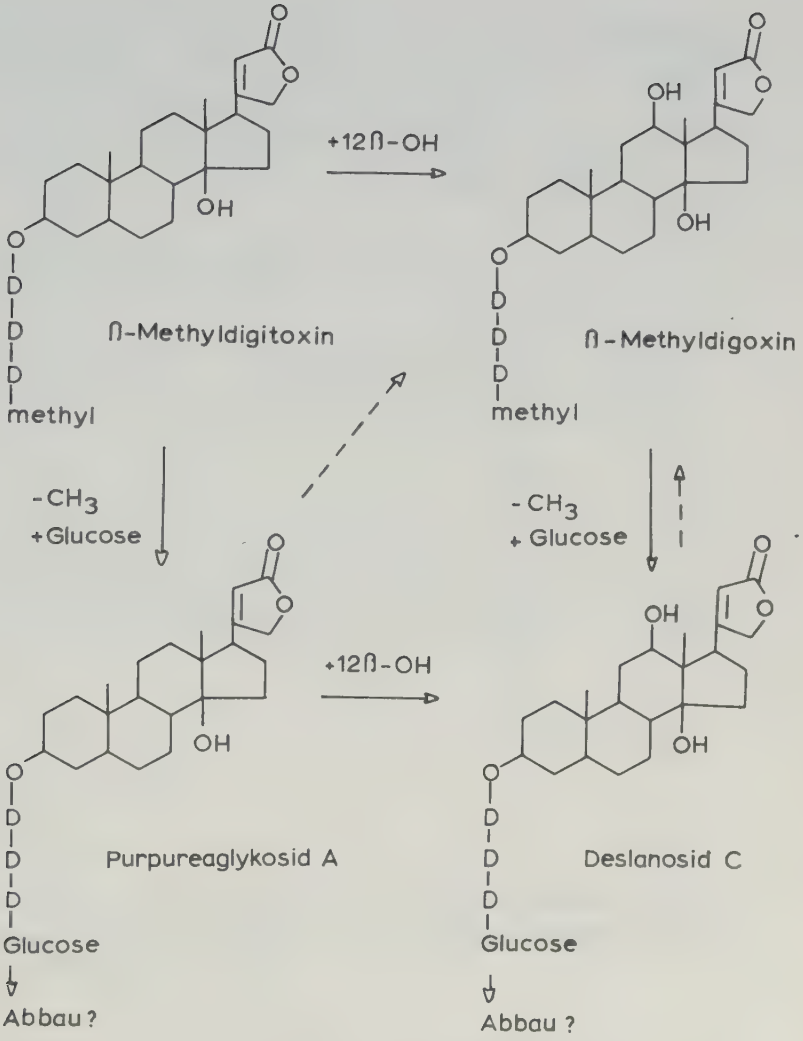


Abb. 21 Reaktionsschema der Umwandlung von ß-Methyldigitoxin durch Zellkulturen des Stammes 291 in NII-Nährmedium.

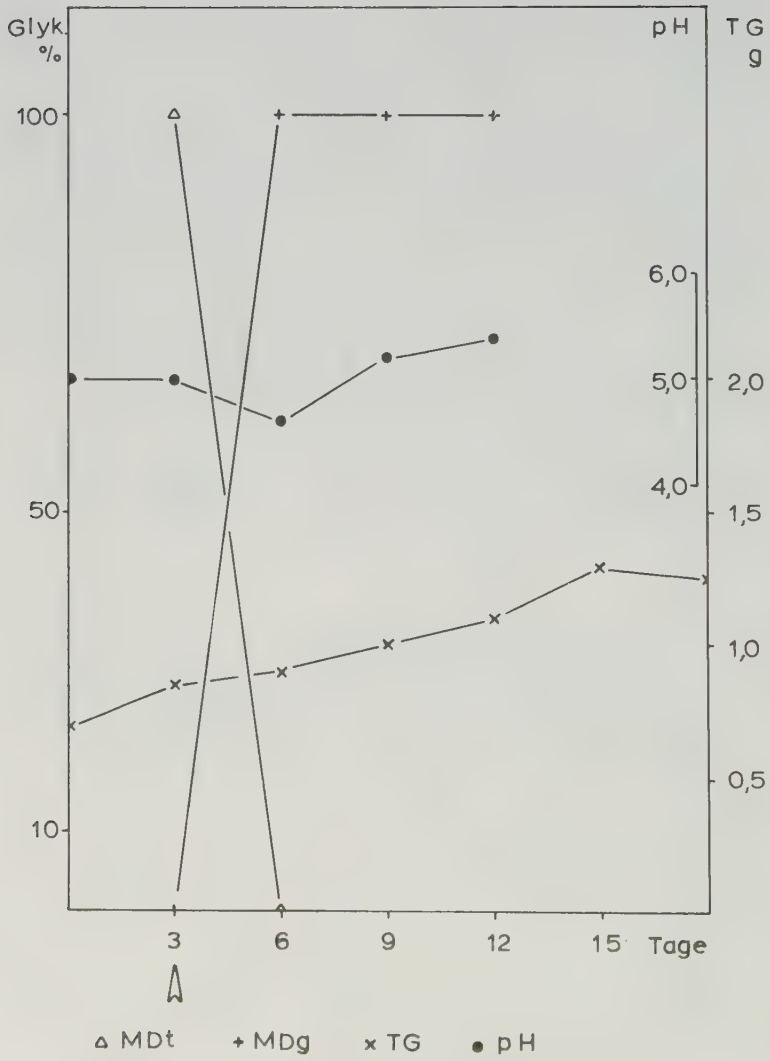


Abb. 22 Zellstamm 291 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Eine definitive Entscheidung, ob ursächlich Rückreaktionen oder Abbau vorlagen, konnte ohne den Einsatz radioaktiv markierter Substanz nicht getroffen werden.
Umso größere Bedeutung kam der Ermittlung der Hydroxylierungsrate in der G18-Kultur des Zellstammes 291 zu.

Zellstamm 291 in G18-Nährmedium

Abb. 22: nach 3 Tagen Versuchsdauer war das zugesetzte ß-Methyldigitoxin vollständig zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert. Weitere Umwandlungsprodukte traten zu keinem Zeitpunkt des Versuches auf. Lediglich ein Aufnahmeprozess von ß-Methyldigoxin aus dem Kulturfiltrat in die Gewebefraktion war zu beobachten. Der Anteil dort stieg bis zu 25 % an.
Die Gesamtwiederfindung blieb während des Versuches gleich. Eine stammspezifische hohe Abbaurate mußte daher ausgeschlossen werden.

Zellstamm 291 wies in den beiden verwendeten Kulturmedien deutlich abweichende Biotransformationseigenschaften auf. Das Muster der Umwandlungsreaktionen unterschied sich in qualitativer und quantitativer Hinsicht. Ebenfalls stark beeinflußt von der Medien-Variation war die Reaktionsgeschwindigkeit der Biotransformation. Diese Medien-Einflüsse müßten näher untersucht werden.
Wie schon bei Stamm 287 (Abb. 18) beobachtet, war bei G18-Kulturen (Abb. 22) eine schnelle selektive Hydroxylierung zu verzeichnen, während die NII-Kulturen (Abb. 17 und 20) jeweils ein Glykosidgemisch lieferten.

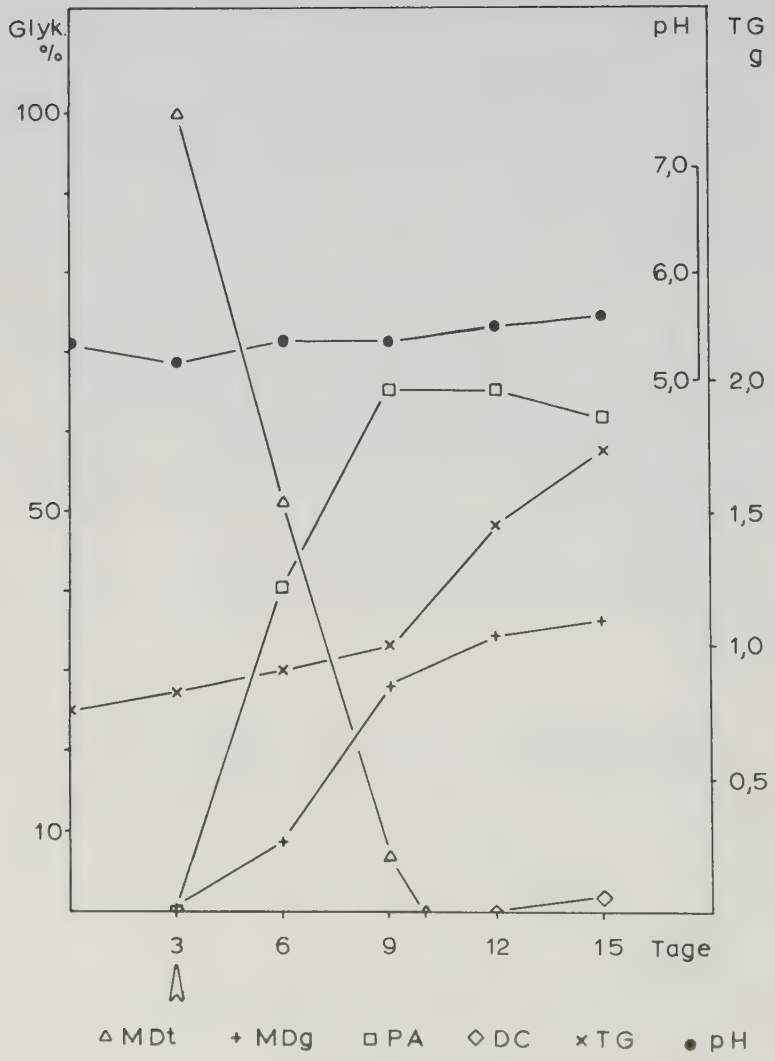


Abb. 23 Zellstamm 293 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 293

Im Umwandlungsversuch Abb. 23 mit diesem Zellstamm setzte sehr schnell Demethylierung und Glucosidierung zu Purpureaglykosid A ein. Nach 6 Tagen war mit 65 % ein Maximum erreicht. Langsamer folgte die Hydroxylierungsreaktion bis zu einem Anteil von 37 % ß-Methyldigoxin. Nach 7 Tagen war das Substrat vollständig umgesetzt. Bei Versuchsende tauchten Spuren von Deslanosid C im Gewebe auf.

Zellstamm 293 BHL

9 Tage nach Zugabe war, wie aus Abb. 24 hervorgeht, die Hälfte des eingesetzten ß-Methyldigitoxins zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert. Nach weiteren 9 Tagen waren 72 % erreicht. Es trat keine Veränderung des restlichen Substrates ein. Unumgewandeltes ß-Methyldigitoxin wurde sowohl in der Gewebefraktion als auch im Kulturfiltrat gefunden.

Zellstamm 347

Nach Abb. 25 wurde das zugegebene Substrat innerhalb von 12 Tagen vollständig zur Umwandlung verbraucht. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde ebenso hydroxyliert wie glucosidiert. ß-Methyldigoxin und Purpureaglykosid A lagen zu je 50 % vor. Gleichzeitig mit dem Trockengewichtsabfall setzte ein Rückgang des Anteils an Purpureaglykosid A und somit eine Zunahme von ß-Methyldigoxin ein. Am 30. Tag lagen 84 % ß-Methyldigoxin und 16 % Purpureaglykosid A vor.

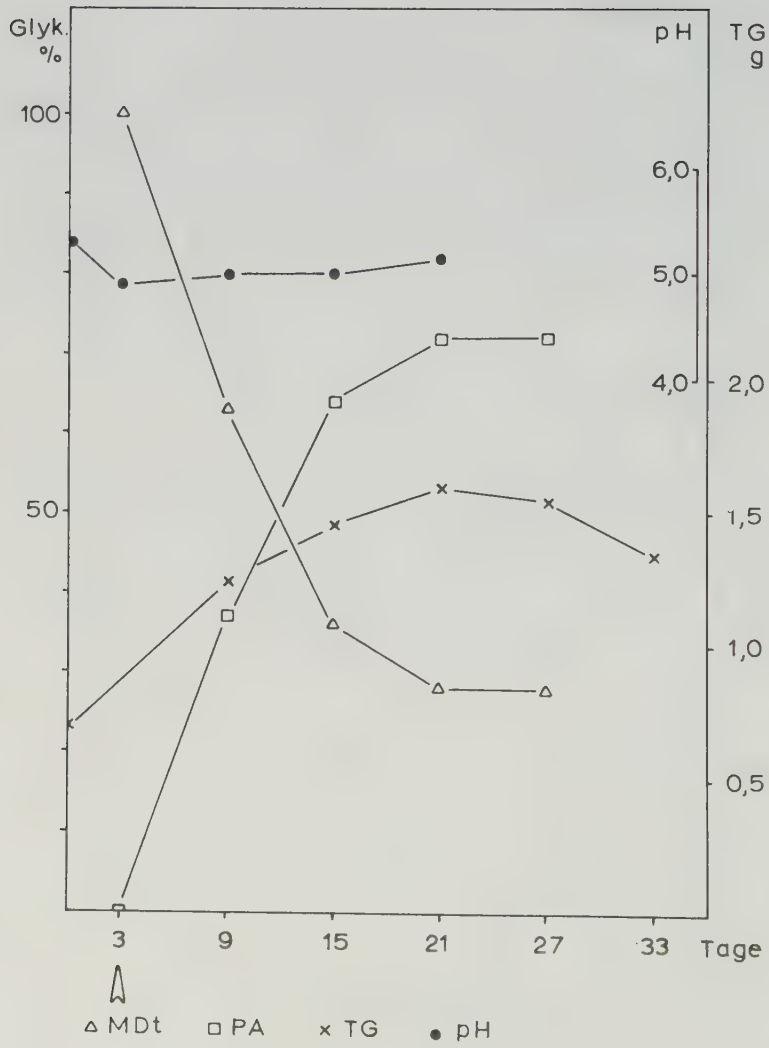


Abb. 24 Zellstamm 293 BHL in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

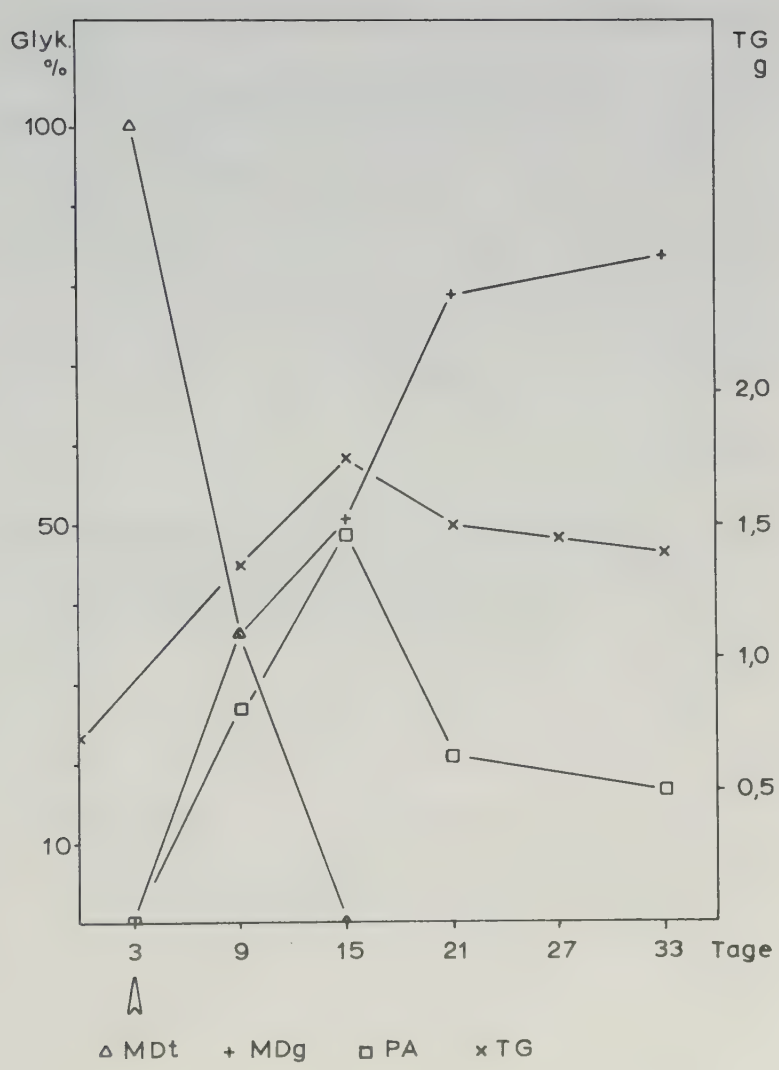


Abb. 25 Zellstamm 347 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 445

Abb. 26 zeigt den Versuchsverlauf nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin zu Kulturen des Zellstammes 445.
Innerhalb von 9 Tagen wurden 55 % des Substrates zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert. Das restliche ß-Methyldigitoxin erschien ebenso wie das Umwandlungsprodukt in der Gewebefraktion. Dort blieb das Restsubstrat unverändert liegen. Die Kulturfiltratextrakte enthielten bei Versuchsende keinerlei Glykoside.

Zellstamm 447

6 Tage nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin zu Suspensionskulturen dieses Zellstammes, dargestellt in Abb. 27, waren 20 % zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert. Am 33. Versuchstag lagen 51 % dieses Umwandlungsproduktes vor, und zwar ausschließlich im Gewebeextrakt. Ebenfalls dort wurden 48 % unverändertes Substrat bestimmt. Das zu Beginn des Versuches in die Gewebefraktion übergegangene Substrat konnte offensichtlich nicht mehr zu Umwandlungsreaktionen herangezogen werden. Während der Gesamtdauer des Versuches traten Spuren des Acetylierungsproduktes Lanatosid A im Gewebeextrakt auf.

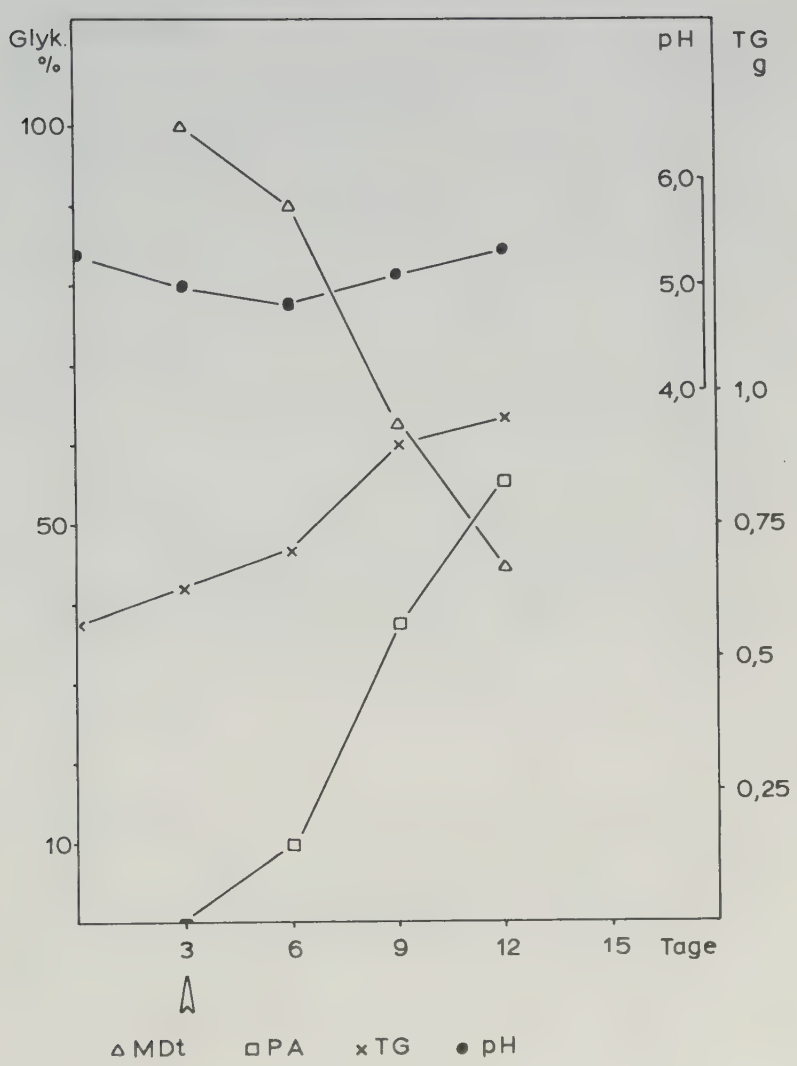


Abb. 26 Zellstamm 445 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

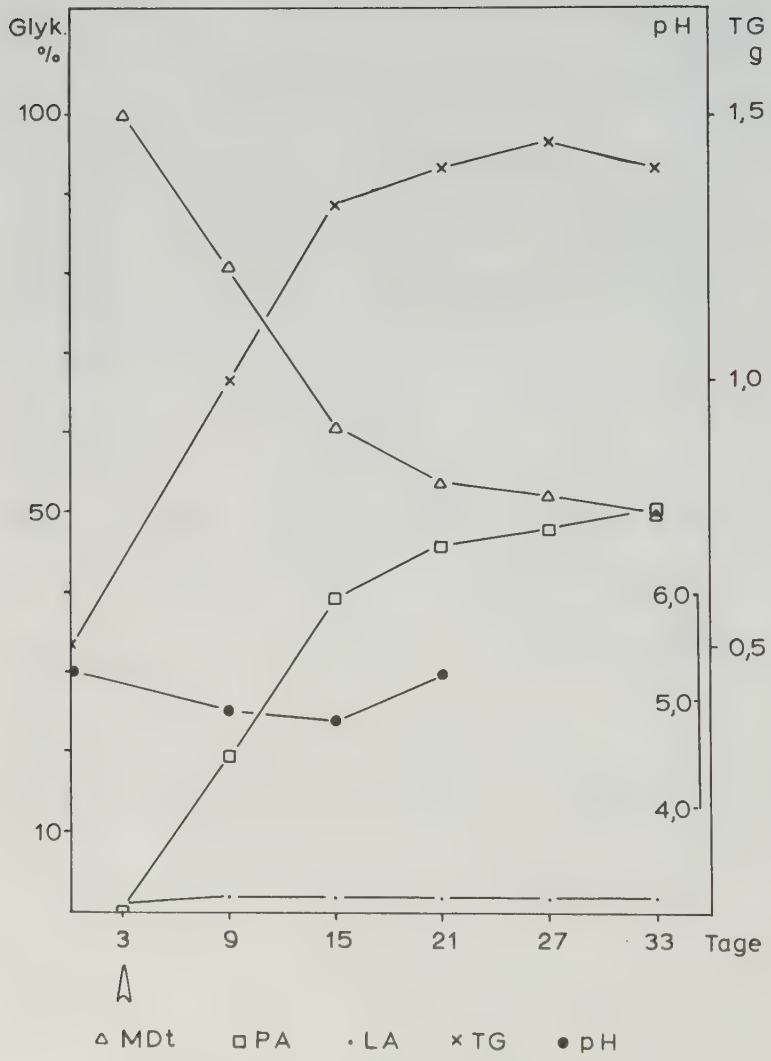


Abb. 27 Zellstamm 447 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 508

Schüttelkulturen des Zellstammes 508 wiesen eine sehr geringe Umwandlungsrate auf. Abb. 28 zeigt, daß in 24 Tagen 20 % Purpureaglykosid A gebildet wurden. Der Rest des Substrates lag als unverändertes ß-Methyldigitoxin vorwiegend in der Gewebefraktion.

Zellstamm 9-14

In diesem Versuch Abb. 29 setzte unmittelbar nach Substratzugabe Hydroxylierung ein. 3 Tage später konnten 27 % ß-Methyldigoxin gemessen werden. Bei Versuchsende waren 90 % erreicht. Als Nebenreaktion verlief Glucosidierung zu Purpureaglykosid A langsam ansteigend bis zu einem Anteil von 10 % in der Gewebefraktion. ß-Methyldigoxin wurde im Verhältnis 1:4 in den Extrakten von Gewebe und Kulturfiltrat bestimmt.

Zellstamm 10-2

Abb. 30: innerhalb von 3 Tagen waren 46 % des angebotenen ß-Methyldigitoxins hydroxyliert und geringe Mengen zu Purpureaglykosid A umgewandelt worden. Nach wiederum 3 Tagen war das Substrat nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurden 89 % ß-Methyldigoxin und 11 % Purpureaglykosid A gemessen. Während der folgenden 6 Tage ging der Anteil von ß-Methyldigoxin auf 84 % zurück zugunsten von Purpureaglykosid A, das mit 16 % in der Gewebefraktion bestimmt wurde. Das hydroxylierte Produkt erschien zum größeren Anteil im Kulturfiltrat.

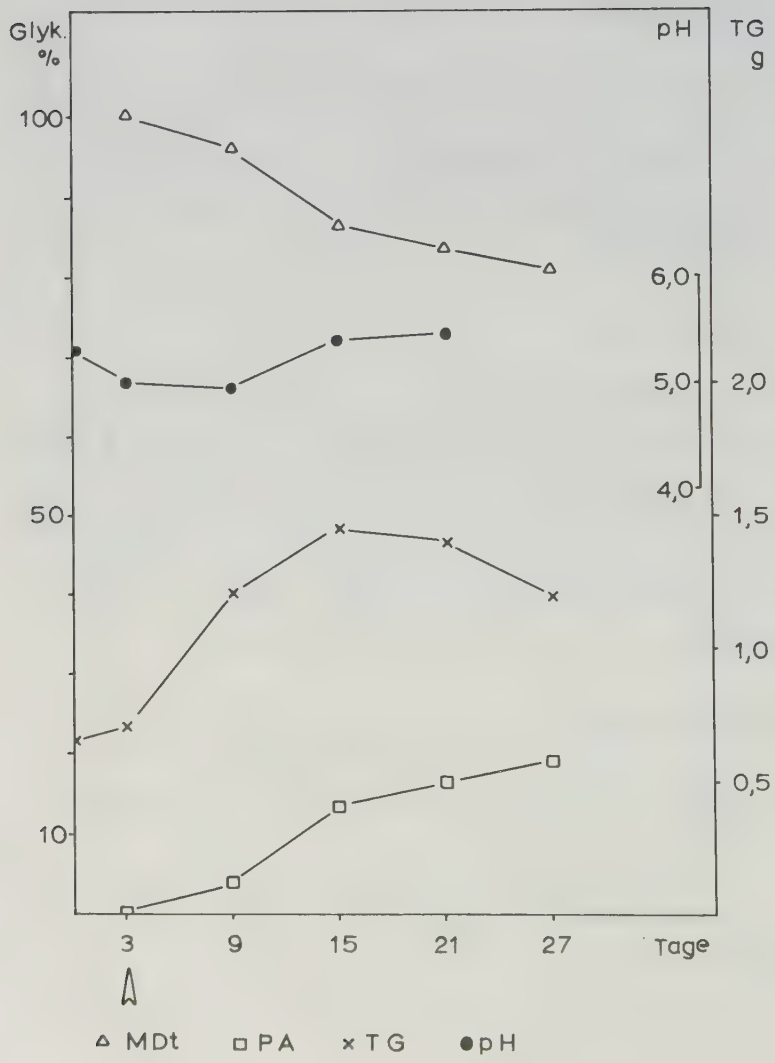


Abb. 28 Zellstamm 508 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

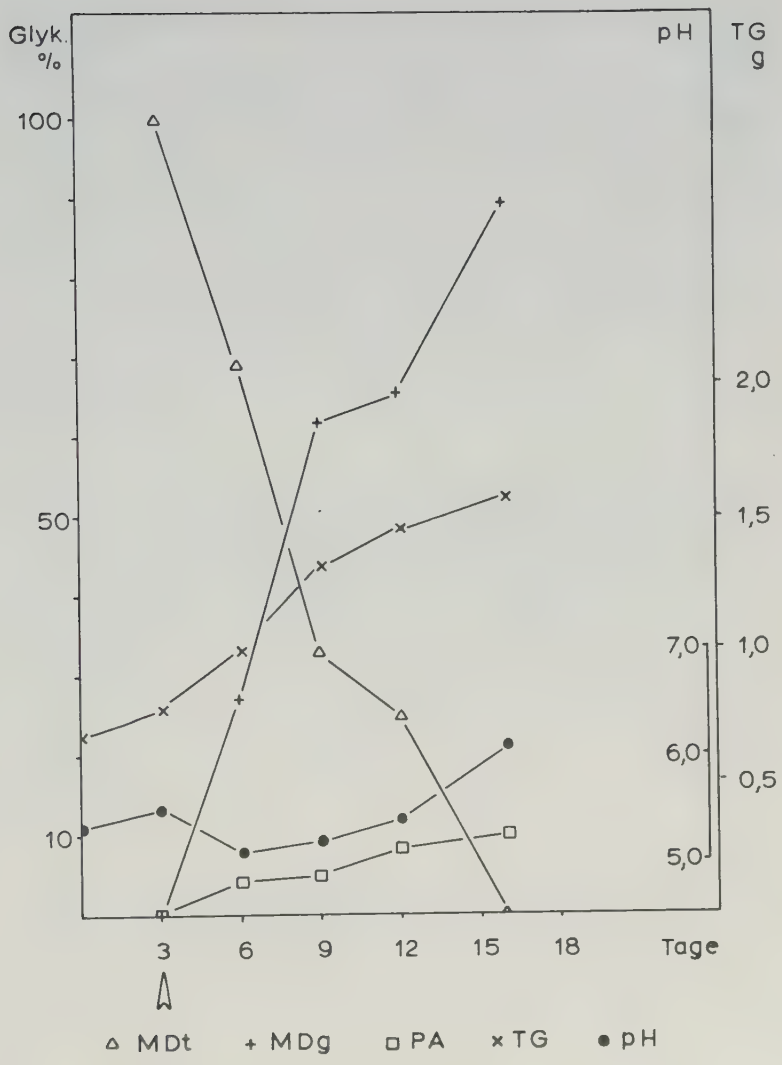


Abb. 29 Zellstamm 9-14 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

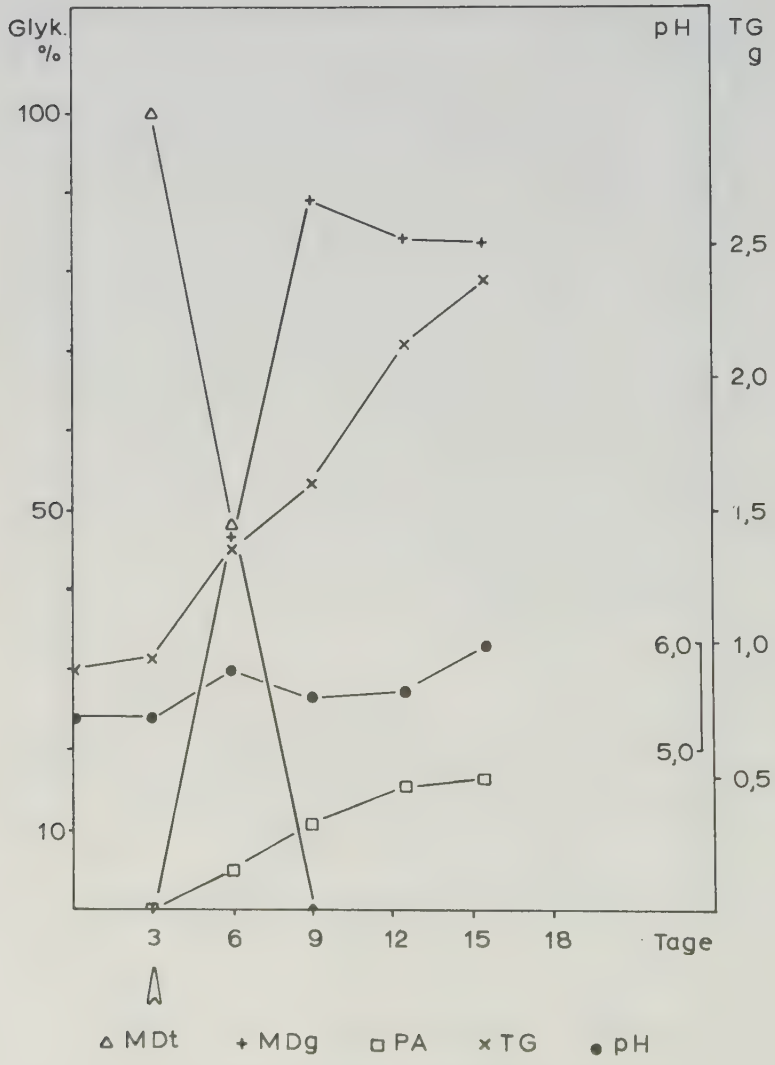


Abb. 30 Zellstamm 10-2 in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm 22-6

Wie aus Abb. 31 zu ersehen ist, begann eine Veränderung des Substrates erst 6 Tage nach Zugabe. 8 % ß-Methyldigoxin traten im Kulturfiltrat auf und geringe Mengen Purpureaglykosid A erschienen in der Gewebefraktion. Der nicht umgewandelte Hauptanteil des Substrates blieb auf beide Fraktionen verteilt: 50 % ß-Methyldigitoxin lagen bei Versuchsabbruch im Kulturfiltrat und 40 % in der Gewebefraktion.

Zellstamm 23-17

In diesem Versuch Abb. 32 fand eine rasche 12ß-Hydroxylierung und eine langsamere Demethylierung und Glucosidierung statt. Bis zum 12. Tag nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin lagen 50 % ß-Methyldigoxin und 12 % Purpureaglykosid A vor. Das restliche Substrat wurde in der Gewebefraktion bestimmt. Im letzten Drittel der Versuchsdauer nahm die Umwandlungsgeschwindigkeit ab. Am 24. Tag zeigt sich folgende Glykosidverteilung: 61 % ß-Methyldigoxin, 16 % Purpureaglykosid A im Gewebe und Rest-Substrat im Gewebe.

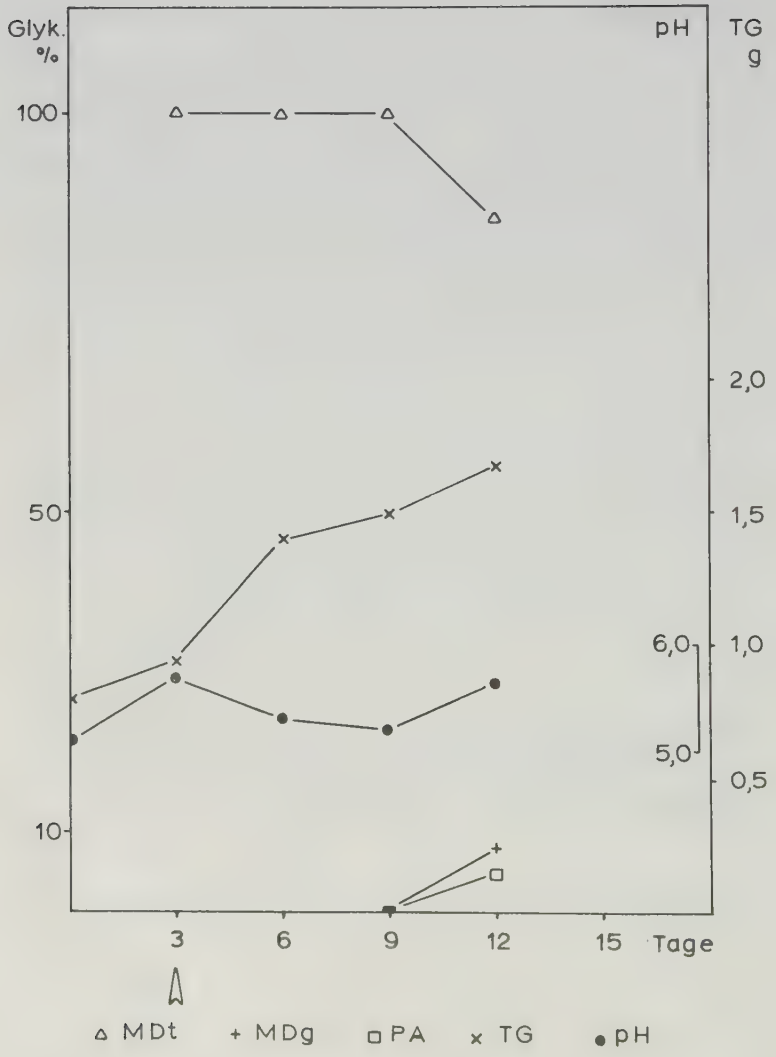


Abb. 31 Zellstamm 22-6 in G18-Nährmedium mit 2 ppm 2,4-D
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

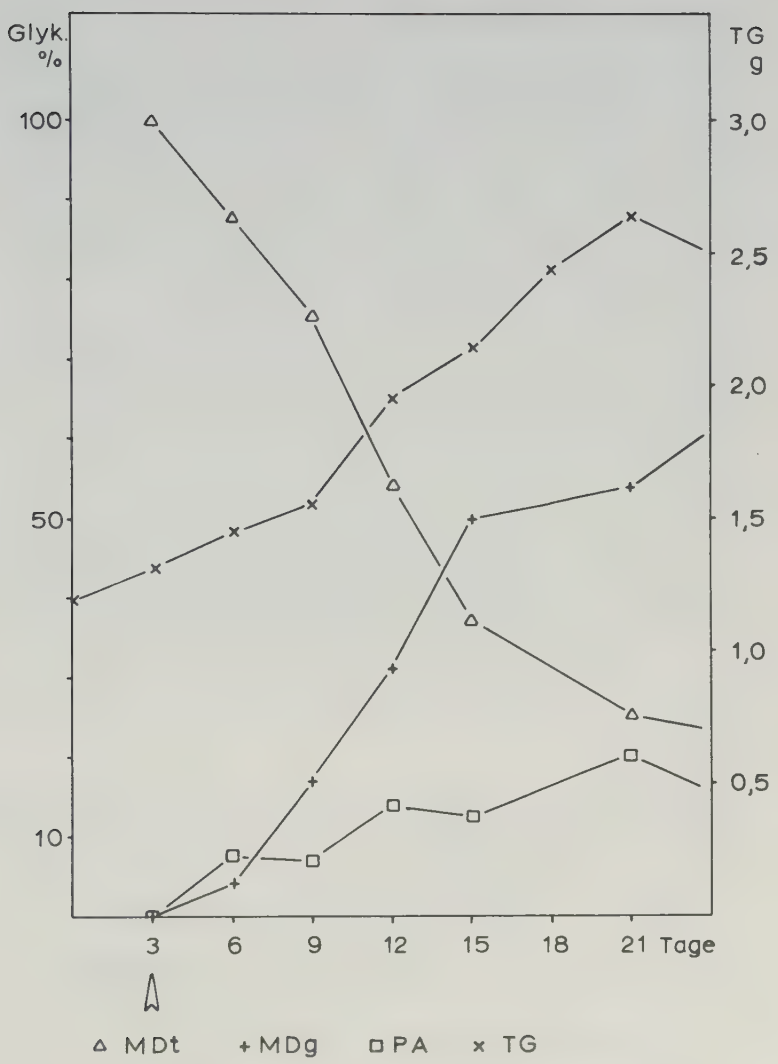


Abb. 32 Zellstamm 23-17 in G18-Nährmedium mit 2 ppm 2,4-D
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Zellstamm E in G18-Nährmedium

Als echte Suspensionskultur mit besonders schnellem Wachstum wurde inzwischen der schon früher untersuchte Zellstamm E in G18-Nährlösung kultiviert. In 12 Tagen nahm die Zell-Trockenmasse auf das 3,5-Fache zu. Diese veränderte Kultur des schon bearbeiteten Stammes wurde nun ebenfalls dem Standardversuch zur Umwandlung von ß-Methyldigitoxin unterzogen.

Abb. 33 gibt den Versuchsverlauf wieder. 7 Tage nach Substratzugabe erreichte die Bildung von Purpureaglykosid A ein Maximum bei 85 %. Dann setzte Hydroxylierung ein. Am 12. Tag lagen 20 % ß-Methyldigoxin vor. Reaktionsschema siehe Abb. 4.

Die Betrachtung des pH-Verlaufs in diesem Versuch läßt einen Zusammenhang zwischen pH-Wert und Hydroxylierung vermuten. Die Entstehung von ß-Methyldigoxin begann erst nach einem pH-Anstieg auf 6,0. Bei Versuchsende wurde ein Wert von 6,4 gemessen.

Zum Zugabezeitpunkt befand sich die Kultur in der Anwachsphase, bei Versuchsabbruch war vermutlich das maximale Trockengewicht und somit die stationäre Phase erreicht.

Die Ergebnisse dieses Versuches wiesen starke Abweichungen auf von den früher mit Stamm E in NII-Nährmedium erzielten. Es war zu klären, ob das veränderte Biotransformationsverhalten auf die Variation des Nährmediums und die damit verbundenen Änderungen der Wachstumseigenschaften zurückzuführen war.

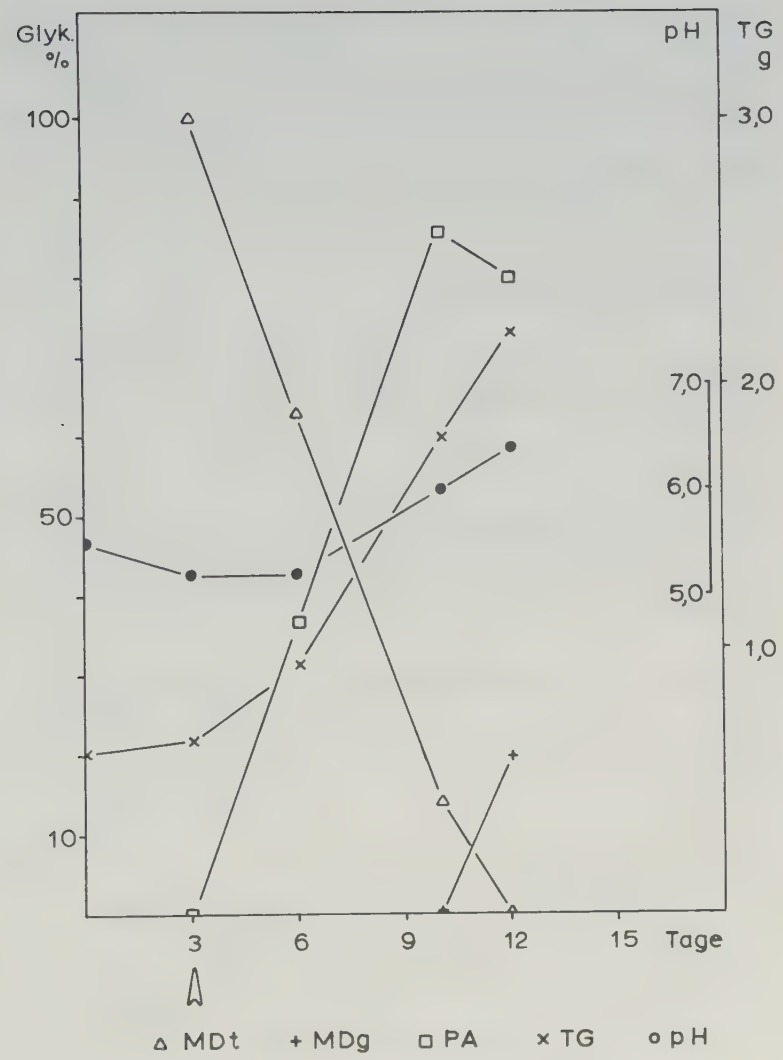


Abb. 33 Zellstamm E in G18-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

Schüttelkulturen in dem ursprünglichen NII-Nährmedium waren parallel weitererhalten worden. Sie wurden ebenfalls nach der Screening-Standardanordnung untersucht, um auszuschließen, daß der Zellstamm E im Laufe längerer Kultivierung seine Umwandlungsfähigkeiten geändert haben könnte, seine 12ß-Hydroxylierungskapazität verloren haben könnte.

Zellstamm E in NII-Nährlösung

In diesem Versuch Abb. 34 entstanden innerhalb von 6 Tagen aus zugesetztem ß-Methyldigitoxin zu 30 % ß-Methyldigoxin und zu 13 % Purpureaglykosid A. Die Glucosidierung war am 15. Versuchstag mit 28 % abgeschlossen. Der Anteil an hydroxyliertem Umwandlungsprodukt belief sich bei Versuchsabbruch auf 68 % ß-Methyldigoxin. Ein Substratrest von 6 % blieb unverändert liegen.

Hydroxylierung einerseits und Demethylierung und Glucosidierung andererseits waren, verglichen mit dem in Abb. 3 dargestellten Versuch mit NII-Submerskulturen desselben Zellstammes, verzögert abgelaufen. Das Glykosidmuster stimmte überein. Die Bestätigung des Versuches nach zwei Jahren mit Zellstamm E in NII-Nährlösung war somit gelungen.

Wie schon bei den Zellstämmen 287 und 291 (Abb. 17, 18 und 20, 22) beobachtet, wies auch Stamm E in NII- und G18-Nährmedium jeweils unterschiedliches Umwandlungsverhalten auf. In diesem Fall wurde in NII-Nährlösung die höhere Hydroxylierungsrate erzielt, während bei den Stämmen 287 und 291 die G18-Kulturen eine vollständige Hydroxylierung des Substrates durchführten.

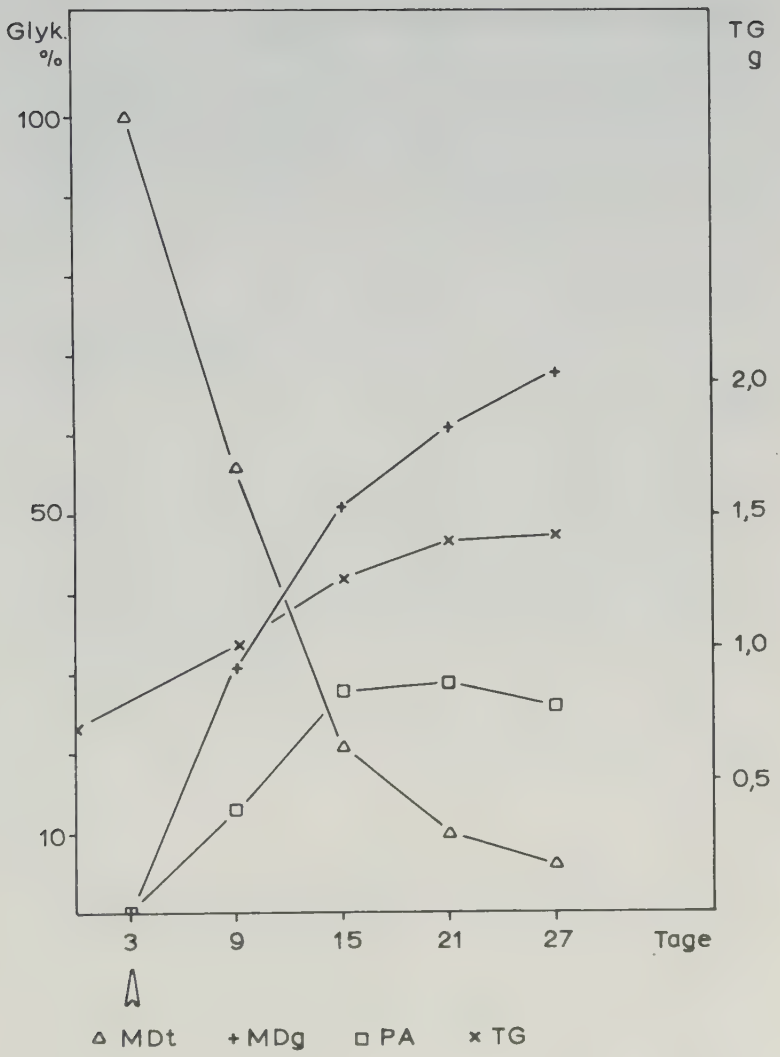
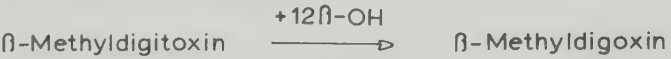


Abb. 34 Zellstamm E in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin

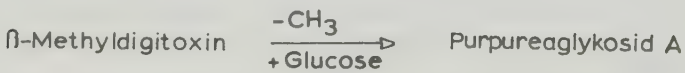
Zusammenstellung der Screening-Ergebnisse

Die untersuchten Zellstämme wiesen deutlich unterschiedliche Verhaltensmuster in der Biotransformation zugesetzten ß-Methyldigitoxins auf. Im wesentlichen ließen sich zwei Reaktionen an ß-Methyldigitoxin nachweisen:

12ß-Hydroxylierung



Demethylierung und Glucosidierung



Die Entstehung von Nebenprodukten sowie der Ablauf sekundärer Reaktionsschritte wurden vernachlässigt bei der Einordnung der untersuchten Zellstämme in Tab. 4. Dargestellt wurden ausschließlich die prozentualen Anteile der Hydroxylierung und der Glucosidierung. Es läßt sich eine Einteilung der Zellstämme in vier Gruppen vornehmen:

1. Selektiv hydroxylierende Zellstämme

2. Mischtyp: hydroxylierende und glucosidierende Zellstämme

3. Selektiv glucosidierende Zellstämme

4. Zellstämme mit sehr niedriger Biotransformationsaktivität

Stamm	Nähr-medium	MDg %	PA %	MDt % Rest
291	G18/NII	100	-	-
287	G18	100	-	-
285	NII	99	Spur	-
9-14	G18	90	10	-
B2	G18	90	10	-
10-2	G18	89	11	-
347	NII	84	16	-
E	NII	73	26	-
72	G18	64	35	-
23-17	G18	54	20	25
287	NII	52	12	36
293	G18	37	63	-
364	G18	36	31	32
E	G18	20	80	-
22-6	G18	8	5	87
128	NII	-	72	28
293 BHL	NII	-	72	28
445	NII	-	55	45
130	NII	-	51	49
447	NII	-	50	50
228	NII	-	26	74
508	NII	-	20	80
216	NII	-	Spur	99

Tab. 4 Glykosidmuster der untersuchten Zellstämme zum Zeitpunkt maximaler Hydroxylierung des zugesetzten ß-MDt.

Zielsetzung bei der Untersuchung des Umwandlungsverhaltens von Digitalis lanata - Zellkulturen war die Selektion 12ß-hydroxylierender Zellstämme.

Typ 1 Selektiv hydroxylierende Zellstämme

Zellkulturen der Stämme 291, 287 und 285 waren dieser Gruppe zuzuordnen. Die vollständige 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin war innerhalb von 3 Tagen beendet bei den Zellstämmen 291 (Abb. 22) und 287 (Abb. 18). Von Zellstamm 285 wurde eine Versuchsdauer von 12 Tagen benötigt (Abb.16). Nach längerer Inkubation entstand in Zellkulturen des Stammes 287 aus dem Hydroxylierungsprodukt das Primärglykosid Deslanosid C (Demethylierung und Glucosidierung). Jedoch ließe sich durch einen geeigneten Erntetermin ß-Methyldigoxin als einziges Reaktionsprodukt erhalten. Bei Abernten der Schüttelkulturen nach soeben abgeschlossener 12ß-Hydroxylierung könnte dem Ablauf der Sekundärreaktion vorgebeugt werden. Diese Überlegung hat Bedeutung für eine spätere Gewinnung des gebildeten ß-Methyldigoxins. Somit erscheint Zellstamm 287 mit einer 100 %igen Hydroxylierungsrate.

Typ 2 Mischtyp: hydroxylierende und glucosidierende Stämme

Die größte Gruppe der untersuchten Zellstämme bewirkte an zugesetztem ß-Methyldigitoxin zu einem Teil 12ß-Hydroxylierung zu ß-Methyldigoxin und zu einem Teil Demethylierung und Glucosidierung zu Purpureaglykosid A. Dabei wiesen die Kulturen in der ersten Hälfte der Gruppe recht gute Hydroxylierungsraten auf. Bei Versuchsende lag jedoch stets ein Gemisch von Sekundär- und Primärglykosiden vor.

Es darf mit Sicherheit nicht postuliert werden, daß die Umwandlungsreaktionen an ß-Methyldigitoxin ausschließlich in einer Richtung verliefen. Bereits die bei Zellstamm 287 in Abb. 18 beobachtete sekundäre Demethylierung und Glucosidierung ß-Methyldigoxins zu Deslanosid C zeigte, daß bei längerer Inkubation mehrere Reaktionsschritte aufeinander folgen können. Nach Abb. 21 gelten verschiedene Reaktionswege. An dieser Stelle soll der Versuchsverlauf bei Zellstamm 347 (Abb. 25) betrachtet werden. Bis zum 12. Tag des Experimentes war das Substrat zur Hälfte demethyliert und glucosidiert, zur Hälfte 12ß-hydroxyliert. Die als Endwert ermittelte Hydroxylierungsrate von 84 % läßt sich nur als Rückreaktion (Methylierung) und Hydroxylierung des zunächst entstandenen Purpureaglykosid A verstehen - wenn man nicht einen ungleichmäßigen Abbau beider Substanzen als Ursache annehmen will.

Typ 3 Selektiv glucosidierende Zellstämme

Die Stämme, die diesem Typ zugeordnet wurden, wandelten ß-Methyldigitoxin ausschließlich zu Purpureaglykosid A um. Die Methylgruppe des Substrates wurde abgespalten und durch Glucose ersetzt.

Typ 4 Stämme mit sehr niedriger Biotransformationsaktivität

Bei einigen Zellstämmen blieb das zugesetzte ß-Methyldigitoxin weitgehend unverändert liegen. Zu dieser Gruppe wäre auch Zellstamm 22-6 (Abb. 31) zu zählen, der in Tab. 4 jedoch als Mischtyp eingestuft wurde aufgrund seiner - wenn auch sehr geringen - Hydroxylierungskapazität. Zellstamm 216 muß als nahezu inaktiv bezeichnet werden.

Glykosidverteilung in Zellkulturen nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe

Allgemein läßt sich von den erhaltenen Versuchsergebnissen die folgende Aussage ableiten:
das Substrat ß-Methyldigitoxin sowie aus der 12ß-Hydroxylierung resultierendes ß-Methyldigoxin waren hauptsächlich in den Extrakten des Kulturfiltrates zu finden. Glucosidierte Reaktionsprodukte - im wesentlichen Purpureaglykosid A - traten fast ausschließlich in Extrakten der Gewebefraktion auf.
In diesem Zusammenhang wird ausdrücklich von Gewebefraktion gesprochen, da im Rahmen dieser Arbeit nicht entschieden werden konnte, ob die Glykoside in den pflanzlichen Kalluszellen innerhalb der Vakuole, in Interzellularräumen oder lediglich an der Oberfläche der Zellen oder Zellaggregate adsorbiert vorlagen.

Deshalb schien es interessant, die Glykosidverteilung innerhalb der Zellkultur vom Zeitpunkt der Zugabe an zu untersuchen. Zu prüfen war ein möglicher Zusammenhang zwischen der Substratverteilung und der anschließenden Umwandlung.
Im folgenden wurde am Beispiel je eines Zellstammes der nach Tab. 4 definierten Gruppen aufgeschlüsselt, wie die im Versuchsverlauf auftretenden Glykoside anteilig in der Gewebefraktion oder im Kulturfiltrat identifiziert werden konnten.

Typ 1 Selektiv hydroxylierender Zellstamm 287
Abb. 35

Der Verlauf der Zugabe von ß-Methyldigitoxin zu dieser Zellkultur ist in Abb. 18 dargestellt.

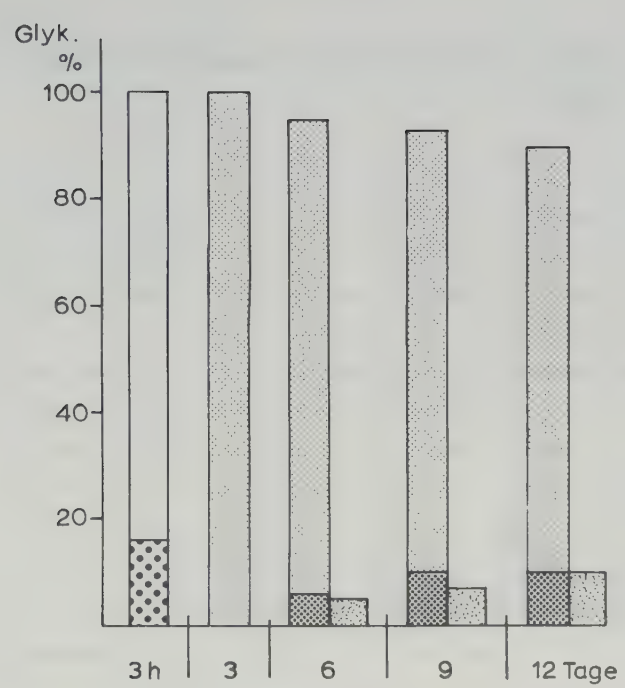


Abb. 35 Glykosidverteilung nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe in der G18-Kultur des Zellstammes 287.

MDt im Kulturfiltrat, MDt im Gewebe,
MDg im Kulturfiltrat, MDg im Gewebe,
DC im Gewebe.

Das Substrat erschien nach 3 Stunden zu 16 % im Gewebe, zu 84 % im Kulturfiltrat. Innerhalb von 3 Tagen lief vollständige 12ß-Hydroxylierung ab. Das gebildete ß-Methyldigoxin trat im Kulturfiltrat auf. Am 6. Tag nach Substratzugabe setzte ein Übergang des Reaktionsproduktes in die Gewebefraktion ein. Am 9. Tag wurden 10 % dort gefunden. Parallel zum letzteren Aufnahmeprozess entstanden geringe Mengen Deslanosid C durch Demethylierung und Glucosidierung von ß-Methyldigoxin im Gewebe.

Typ 2 Mischtyp: hydroxylierender und glucosidierender Zellstamm 10-2

Abb. 36

Im Umwandlungsversuch Abb. 30 hatten Schüttelkulturen dieses Zellstammes eine Hydroxylierungsrate von 89 % ß-Methyldigoxin gezeigt. Die Rest-Glykosidmenge lag als Purpureaglykosid A im Gewebeextrakt vor.
Folgendes Verteilungsbild ergab sich unmittelbar nach der Zugabe von ß-Methyldigitoxin: nach 3 Stunden wurden 17 % in der Gewebefraktion und 83 % im Kulturfiltrat gefunden. Die Aufnahme des Substrates erreichte 21 % nach 3 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt war die Substratmenge im Kulturfiltrat bereits auf 28 % zurückgegangen. 40 % ß-Methyldigoxin waren dort entstanden und zusätzlich wurden 7 % im Gewebe bestimmt. Ebenfalls im Gewebeextrakt erschienen 5 % der Gesamt-Glykosidmenge als Purpureaglykosid A. Am 6. Tag nach Substratzugabe war ß-Methyldigitoxin nicht mehr nachweisbar. Es war nahezu vollständig zur Hydroxylierung eingesetzt worden. In geringem Maß stieg auch der Anteil an Purpureaglykosid A - 16 % wurden bei Versuchsende im Gewebeextrakt gemessen.
Nach abgeschlossener 12ß-Hydroxylierung ist wiederum eine Aufnahme des ß-Methyldigoxins in die Gewebefraktion zu verzeichnen. Parallel wurde eine geringfügige Glucosidierung beobachtet.

Wie schon Abb. 35 läßt auch diese Verteilungsdarstellung erkennen, daß das hydroxylierte Umwandlungsprodukt ß-Methyldigoxin zunächst im Kulturfiltrat auftritt und erst allmählich in die Gewebefraktion übergeht.

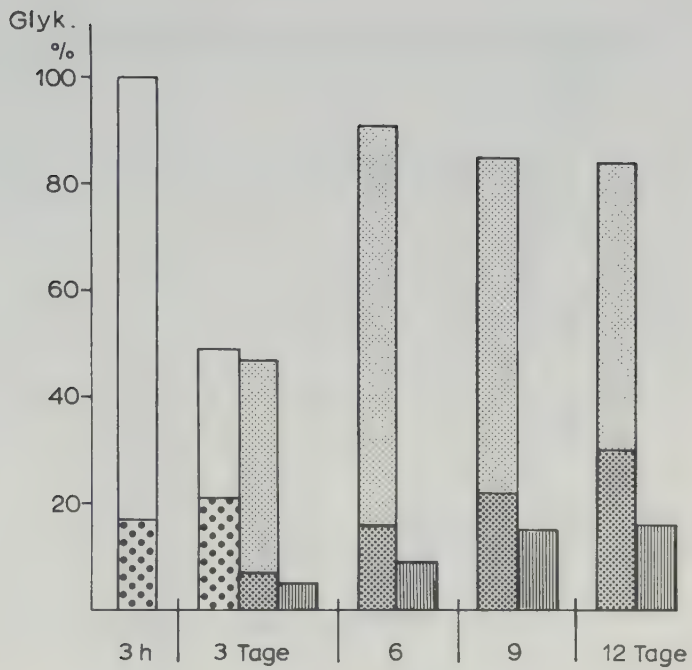


Abb. 36 Glykosidverteilung nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe zu Zellstamm 10-2. MDt im Kulturfiltrat, MDt im Gewebe, MDg im Kulturfiltrat, MDg im Gewebe, PA im Gewebe.

Typ 3 Selektiv glucosidierender Zellstamm 445

Abb. 37

34 % des zugesetzten ß-Methyldigitoxins waren nach 3 Stunden in die Gewebefraktion aufgenommen. Am 3. Tag nach der Zugabe erschienen 10 %, nach weiteren 6 Tagen insgesamt 55 % als Purpureaglykosid A im Gewebeextrakt.

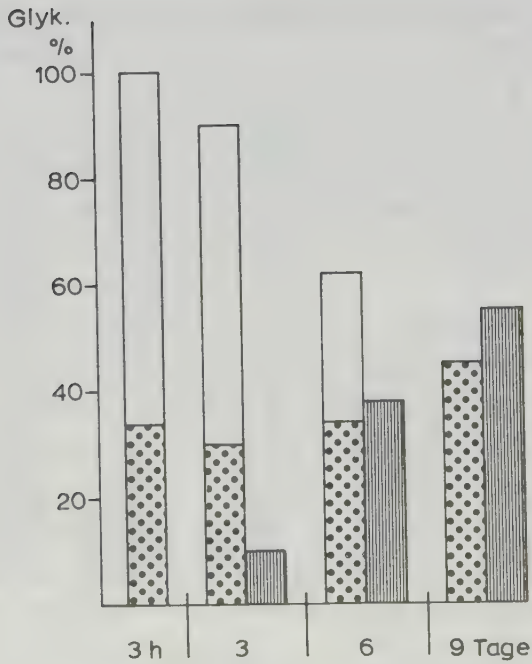


Abb. 37 Glykosidverteilung nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe zu Zellstamm 445. ☐ MDt im Kulturfiltrat, ▒ MDt im Gewebe, ▥ PA im Gewebe.

Aus dem Kulturfiltrat war die gesamte Substratmenge in die Gewebefraktion übergegangen und dort demethyliert und glucosidiert worden. Eine weitere Veränderung des dort vorhandenen Rest-Substrates von 45 % ß-Methyldigitoxin wurde nicht vorgenommen in der Kultur. Diese Erscheinung konnte ebenfalls bei den Zellstämmen 447 (Abb. 27) und 22-6 (Abb. 31) beschrieben werden.

Typ 4 Zellstamm 508 - wenig biotransformationsaktiv
Abb. 38

6 Tage nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin erschienen 85 % der Substanz im Gewebeextrakt, 11 % lagen noch im Kulturfiltrat vor und 4 % waren im Gewebe zu Purpureaglykosid A demethyliert und glucosidiert worden. Nach weiteren 18 Tagen lagen im Gewebe 75 % der Gesamtglykoside als unverändertes ß-Methyldigitoxin. Die fehlenden 10 % waren inzwischen ebenfalls zu Purpureaglykosid A umgesetzt worden. Das im Gewebe gefundene ß-Methyldigitoxin wurde keiner Umwandlung mehr unterzogen.

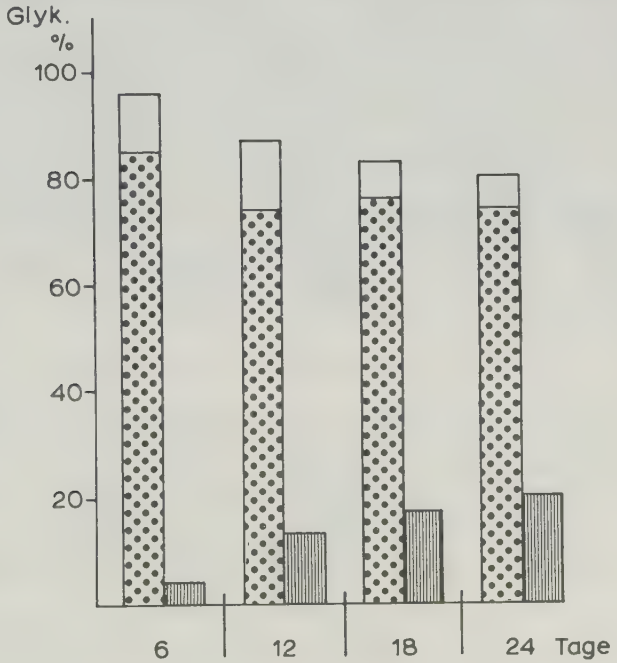


Abb. 38 Glykosidverteilung nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe zu Zellstamm 508. ☐ MDt im Kulturfiltrat, ▨ MDt im Gewebe, ▥ PA im Gewebe.

Die vergleichende Betrachtung der Abb. 35 bis 38 ergibt zusammenfassend folgendes Bild:

Zellkulturen mit hoher Umwandlungsrate zeigen einen vergleichsweise geringen Übergang des Substrates in die Gewebefraktion unmittelbar nach der Zugabe. Eine über Tage andauernde langsame Aufnahme verzögert mögliche Umwandlungsreaktionen. Dies wird deutlich in der Gegenüberstellung der Zellstämme 287 in Abb. 35 und 10-2 in Abb. 36.
Einmal in die Gewebefraktion übergetretenes ß-Methyldigitoxin bleibt dort liegen und wird im weiteren Versuchsverlauf nicht verändert. Die Umwandlungsrate bei Zellstämmen mit hoher Aufnahmerate ist gering. Dies zeigen die Versuche Abb. 37 mit Zellstamm 445 und Abb. 38 mit Zellstamm 508.

Durch die Aufnahme des Substrates und die Lagerung im Gewebe wird somit die Glucosidierung als Umwandlungsreaktion begünstigt, während eine geringe Aufnahme nach der Zugabe von ß-Methyldigitoxin eine gute Voraussetzung für die 12ß-Hydroxylierung zu sein scheint.
Dieser Zusammenhang läßt sich bestätigen durch Vergleich des Biotransformationsverhaltens des Zellstammes 287 in den beiden Nährmedien NII und G18. Wie aus den Abb. 17 und 18 ersichtlich ist, ergaben sich unterschiedliche Glykosidmuster nach ß-Methyldigitoxinzugabe zu diesem Zellstamm in beiden Kulturmedien.
Die Glykosidverteilung in Schüttelkulturen mit G18-Nährlösung ist in Abb. 35 dargestellt. Zugesetztes ß-Methyldigitoxin wurde innerhalb von 3 Stunden zu 16 % in die Gewebefraktion aufgenommen. Nach 3 Tagen lag die Gesamtmenge an Substrat in hydroxylierter Form im Kulturfiltrat vor.

Im Umwandlungsversuch mit Zellstamm 287 in NII-Nährlösung Abb. 17 war ein Glykosidgemisch aus Substrat, ß-Methyldigoxin und Purpureaglykosid A entstanden.

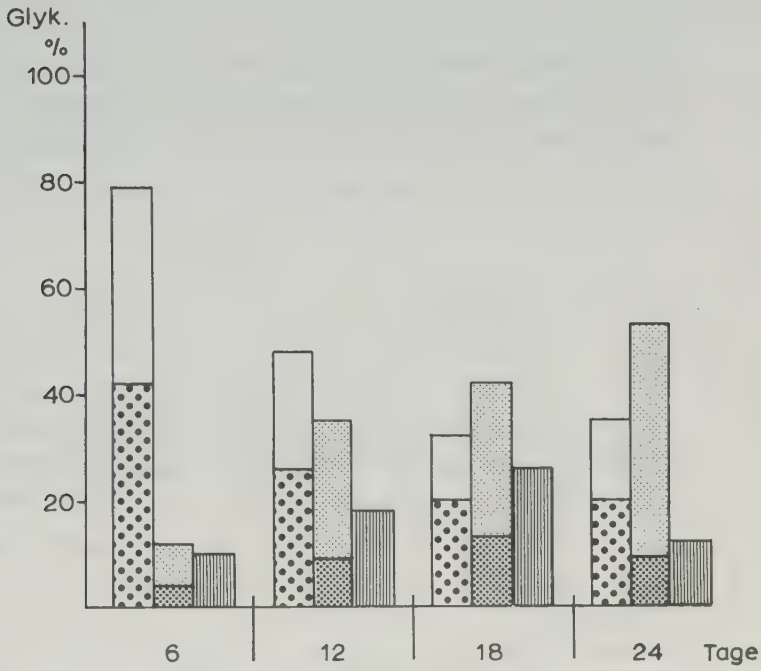


Abb. 39 Glykosidverteilung nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe zu NII-Kultur des Stammes 287. MDt im Kulturfiltrat, MDt im Gewebe, MDg im Kulturfiltrat, MDg im Gewebe, PA im Gewebe.

6 Tage nach Zugabe lagen 42 % ß-Methyldigitoxin im Gewebe und 37 % im Kulturfiltrat vor; bei Versuchsende nach 24 Tagen waren es immerhin noch 20 beziehungsweise 15 %. Das Hydroxylierungsprodukt ß-Methyldigoxin erschien sowohl im Kulturfiltrat als auch im Gewebe. Purpureaglykosid A wurde im Gewebe gebildet.

Die verstärkte Aufnahme und Lagerung von ß-Methyldigitoxin in der Gewebefraktion bewirkt in diesem Versuch Abb. 39 eine niedrigere Umwandlungsrate - und gezielt eine niedrigere 12ß-Hydroxylierungsrate im Vergleich zu Versuch Abb. 35.

Die gefundenen Zusammenhänge zwischen Substrataufnahme in die Gewebefraktion und Glykosidmuster nach ß-Methyldigitoxin-Zugabe lassen sich nach Abb. 40 wie folgt schematisch darstellen:

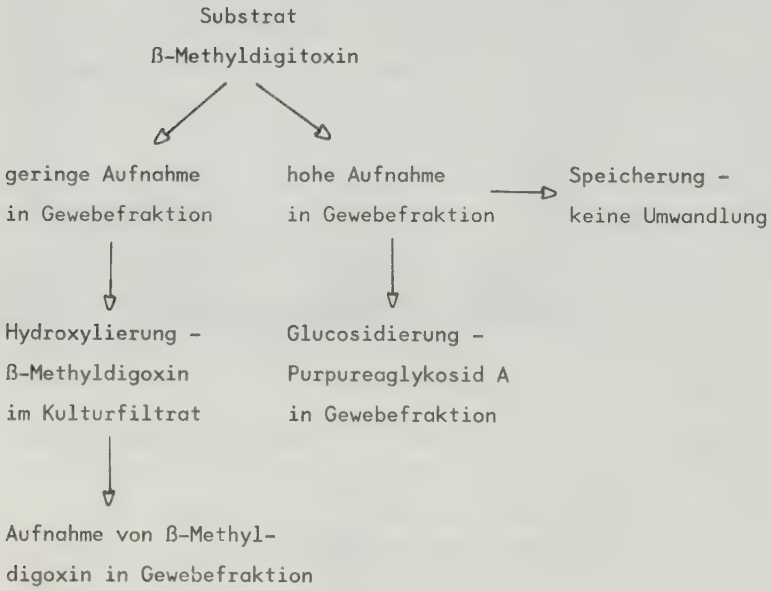


Abb. 40 Übersichtsschema zur Abhängigkeit der Umwandlung von Substratverteilung in der Zellkultur.

Diskussion der Screening-Ergebnisse

Zellkulturen von einheitlich Digoxin-reichem Pflanzenmaterial von Digitalis lanata waren als Untersuchungsobjekt verwendet worden in der Annahme, daß die besonders ausgeprägte Hydroxylierungskapazität der Pflanze in den entdifferenzierten Zellen des entsprechenden Kallus wieder auftreten würde. Nach der allgemein gültigen Auffassung von der Totipotenz der Zelle müßte das hydroxylierende Enzymsystem der Pflanze auch in der Zellkultur vorliegen.

Die Zellstämme des vorangegangenen Screening-Teils der Arbeit zeigten jedoch signifikante Unterschiede im Biotransformationsverhalten gegenüber zugesetztem ß-Methyldigitoxin. Die von REINHARD (1974) beschriebene 12ß-Hydroxylierung wurde nicht von allen untersuchten Suspensionskulturen durchgeführt. Statt dessen wurde ein zweiter Reaktionsweg beobachtet, den schon die Ergebnisse von BOY (1975) und WAHL (1977) mit Digitalis lanata - Zellstamm 72 aufzeigten: die synthetisch eingeführte Methylgruppe des Substrates wurde abgespalten nach Zugabe zur Zellkultur und Glucose wurde gebunden.

Nach der Gruppeneinteilung der untersuchten Zellstämme in Tab. 4 lassen sich für beide Reaktionswege Kulturen aufzählen, die selektiv einen Umwandlungsschritt durchführen: Typ 1 hydroxyliert selektiv, Typ 3 glucosidiert selektiv. Die größere Anzahl von Zellstämmen gehört einem "Mischtyp" an. Bei diesen Kulturen liefen beide Reaktionen ab, entweder gleichzeitig oder nacheinander.

Als wesentlicher Faktor für den Ablauf von Umwandlungsreaktionen sind zunächst die Medieneinflüsse zu nennen. Auf vielfältige Weise kann man sich den Eingriff der Medienzusammensetzung in das Biotransformationsverhalten einer Zellkultur vorstellen.

Es muß vorausgeschickt werden, daß alle in den Umwandlungsversuchen erhaltenen stammspezifischen Glykosidmuster ausschließlich für die verwendeten Nährmedien gelten. Zunächst mußte bei der Kultivierung der Zellstämme eine gewisse Selektion auf Wachstum in Kauf genommen werden. Dabei sind optimale Milieubedingungen für eine Biotransformation - und speziell für eine 12ß-Hydroxylierung - nicht unbedingt erzielt worden. Es muß aber davon ausgegangen werden, daß die verschiedenen Zellstämme unterschiedliche Anforderungen an die Zusammensetzung eines für Wachstum oder Umwandlung optimalen Nährmediums stellen. Dies beweisen die stark voneinander abweichenden Wachstumsraten der Zellkulturen einerseits, und in Bezug auf die Umwandlung ergibt sich dies aus der vergleichenden Betrachtung der Zellstämme E, 291 und 287. Alle drei Stämme konnten auf beiden Medien parallel kultiviert werden und ergaben im Umwandlungsversuch mit ß-Methyldigitoxin unterschiedliche Glykosidspektren.

Die Zellstämme 291 und 287, kultiviert in G18-Nährlösung, traten als selektive Hydroxylierer auf, in NII-Suspensionskulturen lieferten sie ein Glykosidgemisch aus hydroxylierten und glucosidierten Reaktionsprodukten.

Entgegengesetzt verschoben war die Umwandlung bei Stamm E. Während bei den Kulturen in NII-Medium eine gute Hydroxylierungsrate bestimmt wurde, konnte mit den G18-Schüttelkulturen

nur noch geringfügig und verzögert ß-Methyldigoxin nachgewiesen werden. Hierbei sei erinnert an den Vorversuch mit der Dunkelkultur E. In NII-Nährmedium wurde in diesem Versuchsverlauf eine 100 %ige Hydroxylierungsrate erzielt.

Daher wäre näher zu untersuchen, wie die Zusammensetzung des Kulturmediums in die Biotransformationsvorgänge in pflanzlichen Zellen eingreift.
In Betracht ziehen sollte man die Möglichkeit einer reversiblen Steuerung durch Faktoren wie pH, Ionenkonzentration und Phytohormone. Zahlreiche Beispiele aus Arbeiten über Sekundärstoffproduktion wären zu nennen.

Ein möglicher Regelmechanismus wurde in dieser Arbeit gefunden durch Betrachtung der Glykosidverteilung in der Zellkultur. Abb. 40 stellt folgende Zusammenhänge dar:
Zellkulturen, die nach Zugabe des Substrates eine hohe Aufnahmerate von ß-Methyldigitoxin in die Gewebefraktion zeigten, führten bevorzugt Demethylierung und Glucosidierung mit Purpureaglykosid A als Endprodukt im Gewebe durch oder lagerten das Substrat unverändert im Gewebe. Bei keinem der gut hydroxylierenden Zellstämme war zu Beginn der Umwandlung ein ausgeprägter Übergang von Substrat in die Gewebefraktion zu verzeichnen. ß-Methyldigitoxin aus dem Kulturfiltrat wurde zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert; dieses Reaktionsprodukt lag zunächst ebenfalls im Kulturfiltrat vor und wurde erst im Verlauf einer längeren Versuchsdauer ins Gewebe aufgenommen oder an der Oberfläche adsorbiert.

Zur Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Umwandlungswege ist keine generelle Aussage zu machen. Während bei unsubstituiertem Digitoxin die Glucosidierung, wie schon von BOY (1975) beobachtet, innerhalb weniger Stunden vollständig abläuft, werden an ß-Methyldigitoxin schnelle und langsame Glucosidierung festgestellt - ebenso wie schnelle und langsame Hydroxylierung zwischen 3 und 30 Tagen, je nach Zellstamm.

Bis heute gibt es keine detaillierten Vorstellungen bezüglich des für die 12ß-Hydroxylierung verantwortlichen Enzymsystems und seiner Lokalisierung. BÄRISCH et al. (1972) konnten nach Fermentation frischen Pflanzenmaterials von Digitalis lanata unter Luftabschluß, unter Luftdurchleitung sowie in einer Kohlendioxyd-"Atmosphäre" bei Temperaturen zwischen 25°C und 30°C einen erhöhten Digoxingehalt feststellen. Ferner gelang es ihnen, durch Extraktion frischer, lyophilisierter und mildgetrockneter Pflanzen mit Pufferlösung nach Reinigung eine Enzymaktivität zu messen. Glucoseabspaltung sowie 12ß- und 16ß-Hydroxylierung wurden von dieser Extraktfraktion durchgeführt.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten unterschiedlicher Glykosidmuster eines Zellstammes in verschiedenen Kulturmedien sollten kurz die genetischen Eigenschaften von Zellkulturen angesprochen werden. Arbeiten von BLAKELY und STEWARD (1964) und von MELCHERS (1965) zeigen die genetische Uneinheitlichkeit von Kalluszellen innerhalb einer Zellkultur. Danach wäre denkbar, daß Fähigkeiten der ursprünglich omnipotenten Zelle während der Kultivierung verloren gehen oder vorübergehend

stillgelegt werden. Wie schon erwähnt beobachtete KARTNIG (1976), daß die Cardenolidbiosynthese in Oberflächenkulturen von Digitalis purpurea und Digitalis lanata nur unmittelbar nach deren Etablierung ablief und bereits nach kurzer Kulturdauer reprimiert wurde.
Weiterhin wäre denkbar, daß in einer bereits heterogenen Zellkultur eine schnell wachsende Zell-Linie durch günstige Milieubedingungen gezielt andere Linien zurückdrängt und "überwächst", darunter eventuell solche mit höherer Enzymaktivität aber geringerem Wachstum. Mit dieser Überlegung ließen sich auch die unterschiedlichen Hydroxylierungsraten von Licht- und Dunkelkulturen eines Zellstammes erklären. Zellstamm E in den Vorversuchen dieser Arbeit gilt als Beispiel.

Hinweise auf Abbaureaktionen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit nur vereinzelt. Die Abb. 20 und 21 deuten darauf hin. Jedoch wurden Abbauprodukte, die mit den verwendeten Sprühreagentien erfaßt werden konnten, nicht festgestellt.
Wie TEUSCHER (1973) zusammenfassend darstellt, findet in Pflanzen neben der Biosynthese von Sekundärstoffen stets auch ein Abbau statt. Der in Digitalis lanata - Pflanzen ermittelte Digoxingehalt könnte somit als Resultierende aus Biogenese und Metabolismus verstanden werden. So könnten auch in Zellkulturen gleichzeitig Enzymsysteme für die Hydroxylierung und den Abbau der Steroidglykoside aktiv sein. In der Physiologie stellt die Hydroxylierung einer Substanz vielfach selbst einen ersten Schritt im Metabolismus dar. BERLIN und BARZ (1971) beobachteten an Suspensionskulturen von Phaseolus aureus, daß Stämme mit besonders intensiver Isoflavonproduktion auch die höchste Abbaurate aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellstämme von Digitalis lanata mit hoher Biotransformationsaktivität - und gezielt mit hoher 12ß-Hydroxylierungsaktivität gefunden. Jedoch zeigte sich, daß der Digoxingehalt einer Pflanze noch keinen Rückschluß auf die Hydroxylierungsfähigkeit des entsprechenden Kallus und abgeleiteter Kulturen zuläßt.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Digitalis lanata - Zellkulturen mit hoher Hydroxylierungsrate konnte FRIEDRICHSON (1977) aufzeigen. Ausgehend von dem von WEILER (1974) erarbeiteten Hydroxylierungstest für Blätter wird der Zusammenhang von Digoxingehalt des Blattes, Hydroxylierungskapazität des Blattes und Hydroxylierungskapazität der von entsprechendem Kallus angelegten Suspensionskulturen untersucht.

G Versuche zur Ausbeutesteigerung

Im Hinblick auf eine industrielle Nutzung der 12ß-Hydroxylierung sollte versucht werden, die Ausbeute an ß-Methyldigoxin bei der Umwandlung zu erhöhen.
Mit den Zellstämmen 285 und 291 wurden Schüttelkolbenversuche mit größeren Substratmengen unternommen.

Zellstamm 285

Zu Suspensionskulturen von Zellstamm 285 wurden nach Abb. 41 2,5 mg pro Kolben ß-Methyldigitoxin zugesetzt. Dies entsprach der 2,5fachen Dosis des in Abb. 16 dargestellten Standardversuches mit diesem Stamm.
Das Hydroxylierungsmaximum lag bei 50 % ß-Methyldigoxin. Nach 12 Tagen stellte sich ein Reaktionsgleichgewicht ein. Der Anteil an Purpureaglykosid A betrug 7 %. Das restliche Substrat wurde in der Gewebefraktion gefunden.
Trotz unveränderter Aethanolkonzentration gegenüber dem Standardversuch erschien das Wachstum der Kultur in diesem Fall durch die Glykosidzugabe leicht verzögert.

Die auf diese Weise erzielte Ausbeutesteigerung war unwesentlich:
50 % von zugesetzten 7,5 mg = 3,75 mg ß-Methyldigoxin wurden erhalten.
Im Standardversuch waren im gleichen Zeitraum 98 % von 3 mg = 2,94 mg ß-Methyldigoxin gebildet worden.

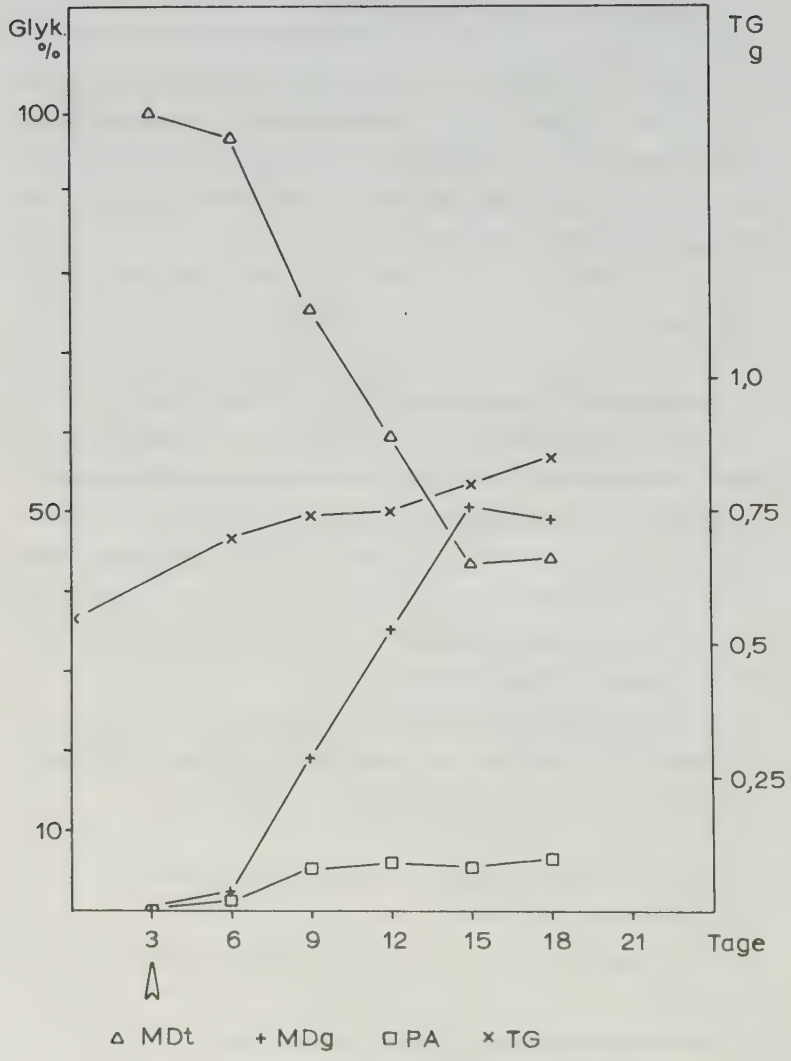


Abb. 41 Zellstamm 285 in NII-Nährmedium
Zugabe von ß-Methyldigitoxin in einer Konzentration von 2,5 mg/ Kolben mit 25 ml.

Zellstamm 291 in G18-Medium
Mehrfachzugabe von ß-Methyldigitoxin

Abb. 42
In Abständen von 6 Tagen wurden Suspensionskulturen von Zellstamm 291 in G18-Nährlösung dreimal mit je 1 mg ß-Methyldigitoxin versetzt.
Jede zugegebene Dosis war nach 3 Tagen vollständig hydroxyliert. Während des Versuches fand ein Übergang des gebildeten ß-Methyldigoxins in die Gewebefraktion statt. Der Verteilung des Glykosids am 6. Versuchstag von 15/85 zwischen Gewebe und Kulturfiltrat stand am 18. Tag die Relation 35/65 gegenüber.

Die Hydroxylierung verlief in dieser Versuchsanordnung völlig unabhängig von pH und Wachstumszustand der Kultur. Bei den ersten beiden Zugaben lag der pH-Wert bei 5,1 bis 5,3. Bei der dritten Zugabe war er auf 6,0 bis 6,1 angestiegen. Von diesem Zeitpunkt an fand keine Trockengewichtszunahme mehr statt. Die dritte Dosis von ß-Methyldigitoxin wurde somit in der stationären Phase der Kultur verabreicht und hydroxyliert.

Unbehandelte Parallelkulturen dienten als Wachstumskontrollen. Die dreimalige Zugabe von Substrat und Lösungsmittel bewirkte eine leichte Depression der Trockengewichtszunahme. Wenn man jedoch die Verdunstung von Nährlösung aus den Kolben und die damit verbundene Erhöhung der Aethanolkonzentration bei der zweiten und dritten Zugabe berücksichtigt, zeigte sich die Kultur recht unempfindlich.

Es war somit gelungen, innerhalb einer Kulturpassage die dreifache Substratmenge zu ß-Methyldigoxin umzuwandeln.

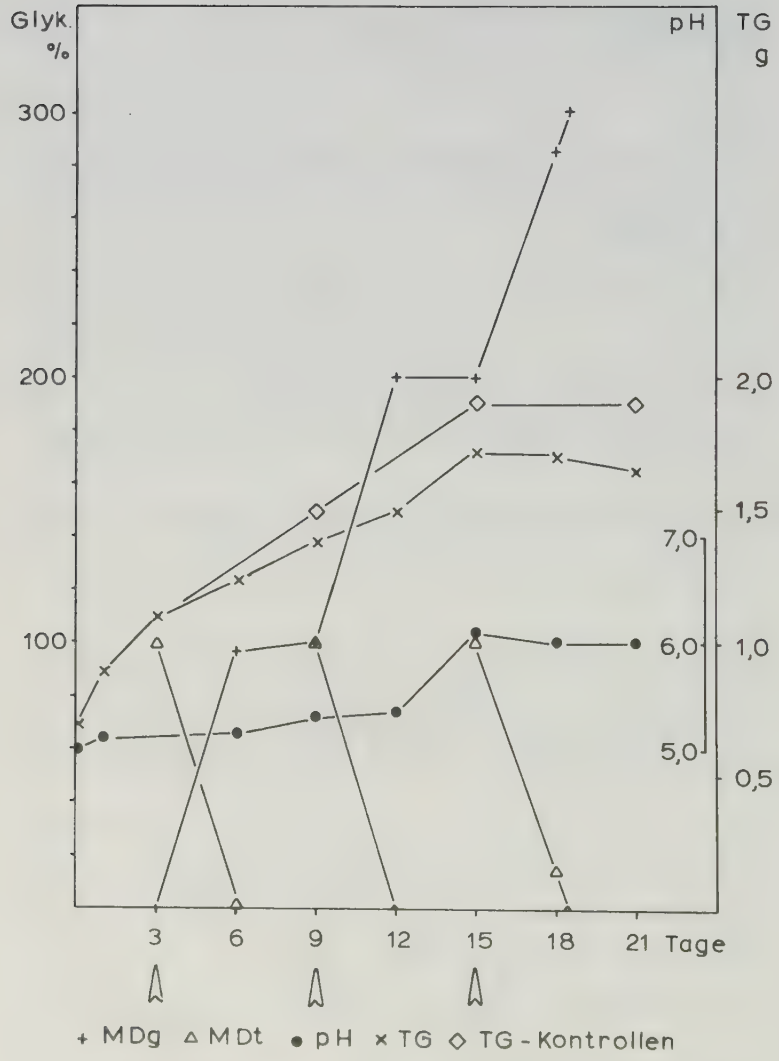


Abb. 42 Zellstamm 291 in G18-Nährmedium
Dreifachzugabe von ß-Methyldigitoxin
am 3., 9. und 15. Kulturtag

H Substratvariation mit Zellstamm 291

Zellkulturen des Stammes 291, der sich durch hervorragende 12ß-Hydroxylierungsfähigkeit auszeichnete, wurden mit den Digitoxigenin-Glykosiden Lanatosid A und Digitoxin inkubiert. Es war zu prüfen, ob dieser Zellstamm andere Substrate ebenfalls selektiv hydroxylieren könnte.

Zellstamm 291

Zugabe von Lanatosid A

Wie Abb. 44 zeigt, wurden innerhalb eines Monats nur knapp 50 % des Substrates verändert. Die Reaktionsschritte waren 12ß-Hydroxylierung und Desacetylierung. Abb. 43 gibt eine Übersicht über den Reaktionsverlauf.
Die Hydroxylierungsprodukte erreichten Maxima am 21. Tag des Versuches: Lanatosid C 35 % und Deslanosid C 10 %. Bei Versuchsende war jedoch Deslanosid C wieder verschwunden, und der Anteil an Lanatosid C war auf 26 % zurückgegangen.
Durch Abspaltung der Acetylgruppe war Purpureaglykosid A zu 25 % der Gesamtglykoside entstanden.
Alle Umwandlungsprodukte wurden in der Gewebefraktion bestimmt.

Gleichzeitig mit der Abnahme der Hydroxylierungsprodukte gegen Versuchsende wurde ein leichter Rückgang der Gesamtmenge der vermessenen Glykoside beobachtet. Dies könnte auf einen bevorzugten Abbau von hydroxylierten Primärglykosiden hinweisen.

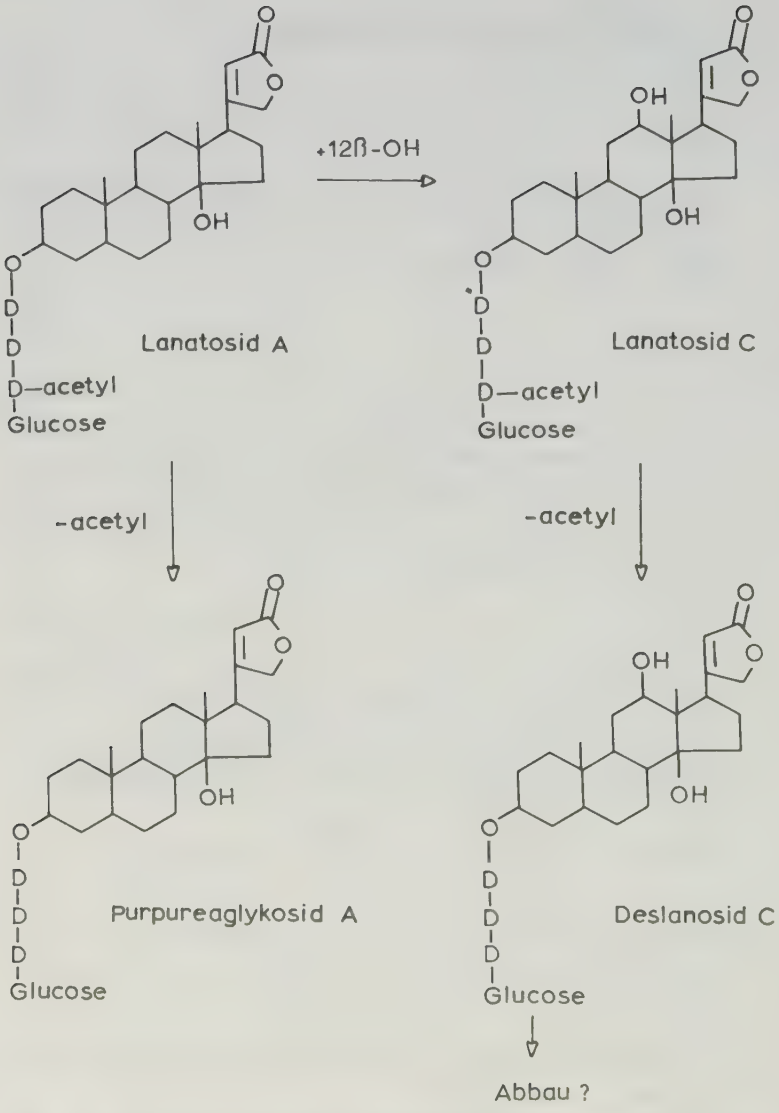


Abb. 43 Reaktionsschema der Umwandlung von Lanatosid A nach Zugabe zu G18-Schüttelkulturen des Stammes 291.

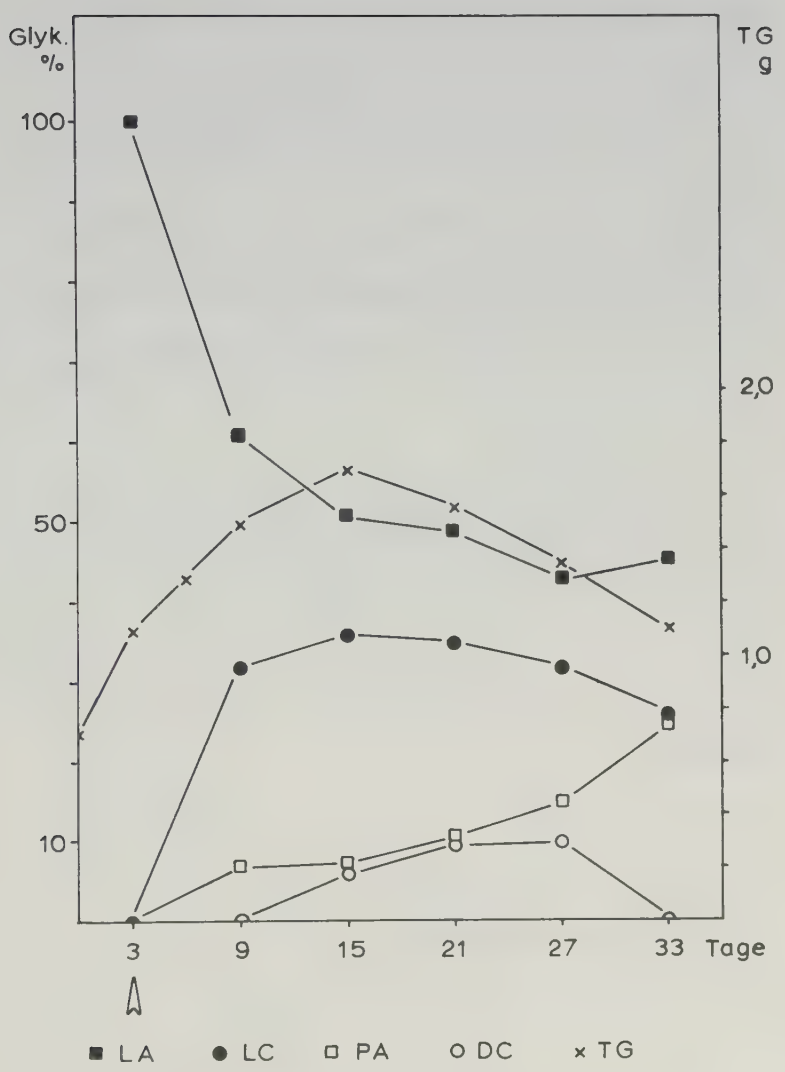


Abb. 44 Zellstamm 291 in G18-Nährmedium
Zugabe von Lanatosid A

Zellstamm 291

Zugabe von Digitoxin

Das unsubstituierte Sekundärglykosid Digitoxin war sehr schneller Veränderung in der Zellkultur unterworfen. 2 Tage nach Zugeben konnten im Kulturfiltrat keinerlei Glykoside mehr nachgewiesen werden. In der Gewebefraktion lagen 50 % zu Purpureaglykosid A glucosidiert und 50 % zu Deslanosid C glucosidiert und hydroxyliert vor.

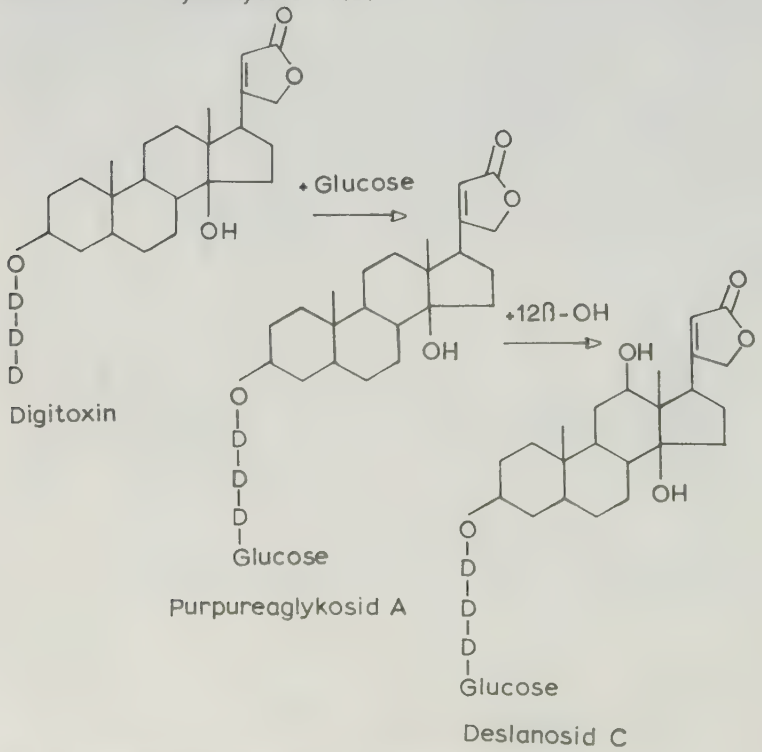


Abb. 45 Reaktionsschema der Umwandlung von Digitoxin nach Zugabe zu G18-Schüttelkulturen des Stammes 291.

Es konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob die 12ß-Hydroxylierung erst nach beendeter Glucosidierung eintrat oder ob beide Reaktionsschritte parallel zur Entstehung von Deslanosid C führten.

Im Interesse einer selektiven 12ß-Hydroxylierung war die Bildung von Primärglykosiden zu unterdrücken. Selbst mit Zellstamm 291 blieb ß-Methyldigitoxin das geeigneteste Substrat zur gezielten Umwandlung von Cardenoliden von der A-Reihe in die C-Reihe.

I Fermenterversuche

Um den Prozess der 12ß-Hydroxylierung wirtschaftlich zu gestalten, mußten Digitalis lanata - Zellkulturen in größerem Umfang in Bioreaktoren kultiviert werden.
TULECKE und NICKELL (1959) arbeiteten in ersten Versuchen mit Zellkulturen in größeren Volumina. Seitdem wurden in erster Linie Kulturgefäße mit Blatt- und Propeller-Rührung eingesetzt. Das Auftreten hoher Scherkräfte bei diesen mechanischen Rührsystemen erwies sich als sehr nachteilig bei der Kultivierung von Digitalis lanata.
Einen geeigneten Bioreaktor entwickelte WAHL (1977). Ein luftgerührter Fermenter mit 20 l Inhalt wurde konstruiert. Dieser Airlift-Typ hatte sich bei der Kultivierung des Digitalis lanata - Zellstammes 72 bewährt und wurde für die Durchführung der im weiteren beschriebenen Versuche dieser Arbeit eingesetzt.

WAHL (1977) zeigte an Fermenterversuchen mit Suspensionskulturen von Stamm 72, daß sich eine Einteilung der Wachstumskurve ähnlich der von Mikroorganismen nach SCHLEGEL (1969) vornehmen läßt. Vier Phasen werden unterschieden: Anwachsphase, logarithmische Wachstumsphase, stationäre Phase und Absterbephase. In den nachfolgenden Fermentationen wurde in den natürlichen Verlauf des Wachstums eingegriffen: die Wachstumsphase wurde durch Ergänzen der verbrauchten C-Quelle verlängert, um Umwandlungsreaktionen über einen längeren Zeitraum in einem einzigen Fermentationsversuch zu ermöglichen.

1. Vorbereitung von Zellkulturen für Fermentationsversuche

Gute Umwälzung im Bioreaktor und repräsentative Probenahme werden nur von einer einheitlich feinen Kultur gewährleistet. In den ersten Passagen der Fermentervorzucht wurden nur sehr kleine Zellaggregate bis zu 1 mm Durchmesser weitergeimpft.

Zur Beurteilung des jeweiligen Wachstumszustandes der Kultur wurde der Verbrauch der Hauptenergiequelle aus dem Nährmedium herangezogen. Der definierten G18-Nährlösung wurden 20 g/l Glucose zugesetzt. Die relativ niedrige Anfangskonzentration sollte das Wachstum der Kultur beschleunigen. Durch enzymatische Messung nach der GOD-Methode konnte zu jedem Zeitpunkt der Vorkultur und der Fermentation die verfügbare Menge an Glucose bestimmt werden.

Die Vorzucht wurde in 1 l - Erlenmeyerkolben angelegt:
30 g sedimentiertes und abgetropftes Gewebe wurden in 300 ml Nährlösung eingewogen. Umgeimpft wurde bei einer Glucose-Restkonzentration von 0,1 %. Es ergab sich eine Impfrate von 1:3. Der Verbrauch der C-Quelle ließ sich schon äußerlich an verstärkt einsetzender Chlorophyllbildung erkennen.

Eine konstant eingestellte Fermentervorkultur wurde erhalten von den Zellstämmen E und 291. Die Passagendauer betrug bei Stamm E 7 Tage, bei Stamm 291 14 Tage.

2. Fermenterkultur Zellstamm E

Bei allen Fermentationsversuchen mit Zellstamm E wurden je 7 Vorzuchtkolben eingeimpft entsprechend einer Inoculumrate von 1:10. Das Trockengewicht der Zellmasse betrug zu Beginn der Fermentation 1,2 g/l, der pH lag bei 5,0 bis 5,1.

Fermenterkultur E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei freilaufendem pH

Abb. 46

Unmittelbar nach Inoculation trat ein steiler pH-Abfall auf einen Wert von 4,0 ein. Bis zum 10. Tag war der Ausgangswert wieder erreicht. Bei einer Zelldichte von 20 g/l Trockengewicht stieg der pH auf 6,1 an.
Die Zugabe von ß-Methyldigitoxin erfolgte am 10. Tag der Fermentation in einer Konzentration von 40 mg/l.
Gleichzeitig wurde mit diskontinuierlicher Glucose-Zugabe von Hand begonnen. Eine mittlere Glucose-Konzentration von 0,5 % sollte im Versuchsverlauf aufrechterhalten werden.
Das zugesetzte Substrat wurde innerhalb von 8 Tagen vollständig demethyliert und glucosidiert. Das entstandene Purpureaglykosid A lag ausschließlich im Extrakt der Zellmasse vor. Das Kulturfiltrat enthielt am 18. Tag der Fermentation keine Glykoside mehr.
Die erreichte Zelltrockenmasse betrug 31 g/l. Mit einer Belüftungsrate von 200 Nl/h war bei dieser Gewebedichte keine zufriedenstellende Umwälzung mehr möglich. Das Sedimentationsvolumen einer Probe nach 20 Minuten Absitzenlassen betrug 90 %.

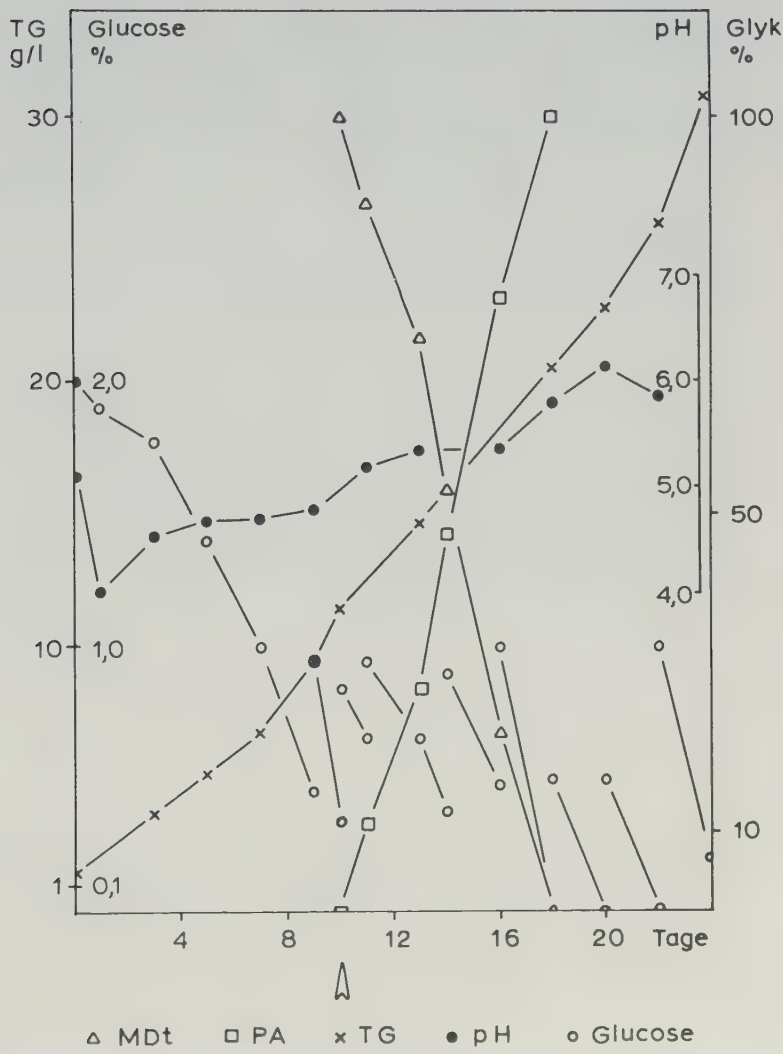


Abb. 46 Fermenterkultur Zellstamm E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei freilaufendem pH
in 20 l - Airlift-Fermenter, 200 Nl Luft/h, 24°C.

Im Schüttelkolbenversuch mit Zellstamm E in G18-Nährmedium Abb. 33 hatte die Hydroxylierung erst bei pH 6,0 eingesetzt. Zudem war es WAHL (1977) gelungen, bei Stamm 72 die Hydroxylierungsreaktion durch pH-Regelung zu induzieren. Dieser Effekt sollte an Fermenterstamm E erprobt werden.

Fermenterkultur E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 6,0
Abb. 47

Vor der Zugabe des Substrates wurde der pH-Wert im Fermenter durch Dosage von 1N-KOH auf 6,0 angehoben. Die Glucose-Konzentration wurde zwischen 0,1 und 0,5 % gehalten.
Die Glucosidierung - einzige Veränderung des zugesetzten ß-Methyldigitoxins - lief in diesem Versuch ebenso schnell ab wie bei ungeregeltem pH.
Das Wachstum der Kultur wurde durch den Eingriff in den pH-Verlauf nicht beeinträchtigt. Die Kurve der Trockengewichte dieser Fermentation zeigt nahezu Deckungsgleichheit mit der aus Abb. 46 abzulesenden.

Es war zu klären, ob sich bei Kulturen des Zellstammes E das Biotransformationsverhalten durch pH-Verschiebung prinzipiell nicht beeinflussen ließe oder ob mit pH 6,0 das Optimum für die Hydroxylierung noch nicht erreicht war.

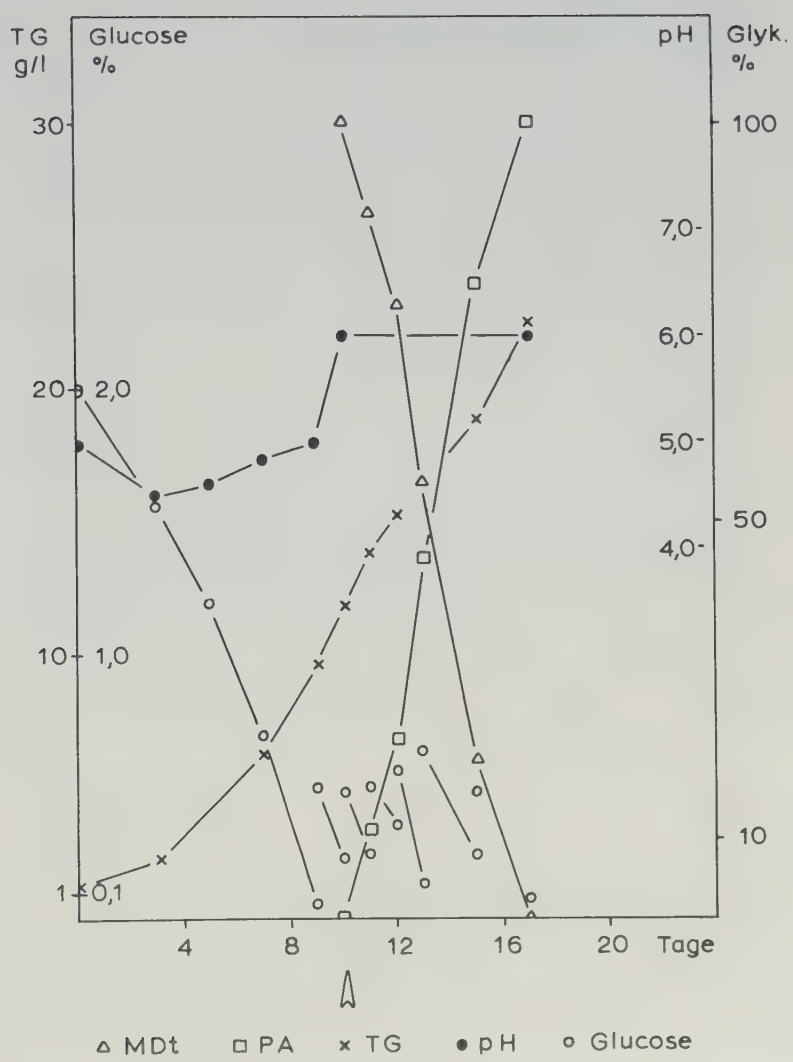


Abb. 47 Fermenterkultur Zellstamm E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 6,0
in 20 l - Airlift-Fermenter, 200 Nl Luft/h, 24°C.

Fermenterkultur E

Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 7,0

Abb. 48

An Tag 11 der Fermentation wurde ß-Methyldigitoxin nach Anheben des pH-Wertes auf 7,0 zugesetzt. Sofort stellte die Kultur das Gewebewachstum ein, die Zellen lysierten. Innerhalb von 4 Tagen wurden 13 % Purpureaglykosid A gebildet. Dann setzte 12ß-Hydroxylierung ein. Nach weiteren 6 Tagen lagen 27 % ß-Methyldigoxin vor. Gleichzeitig war das zunächst entstandene Purpureaglykosid A wieder verschwunden. Als größter Glykosidanteil blieb unverändertes ß-Methyldigitoxin. Aufgrund der Zell-Lyse läßt sich keine Aussage zur Glykosid-Verteilung bei Versuchsende machen: alle Substanzen traten im Kulturfiltrat auf. Eine Stunde nach Zugabe des Substrates konnten 15 % ß-Methyldigitoxin in der Gewebefraktion und 85 % im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt war eine sichere Trennung beider Fraktionen nicht mehr möglich. Der Rückgang des Glucosidierungsproduktes Purpureaglykosid A verlief parallel zur Zell-Lyse.
An dieser Stelle sei verwiesen auf die zu den Versuchen Abb. 20 und 21 diskutierten möglichen Abbaureaktionen.

Mit Zellkulturen des Fermenterstammes E war somit durch pH-Steuerung keine befriedigende Hydroxylierungsrate ohne gleichzeitige Zellschädigung zu erzielen.

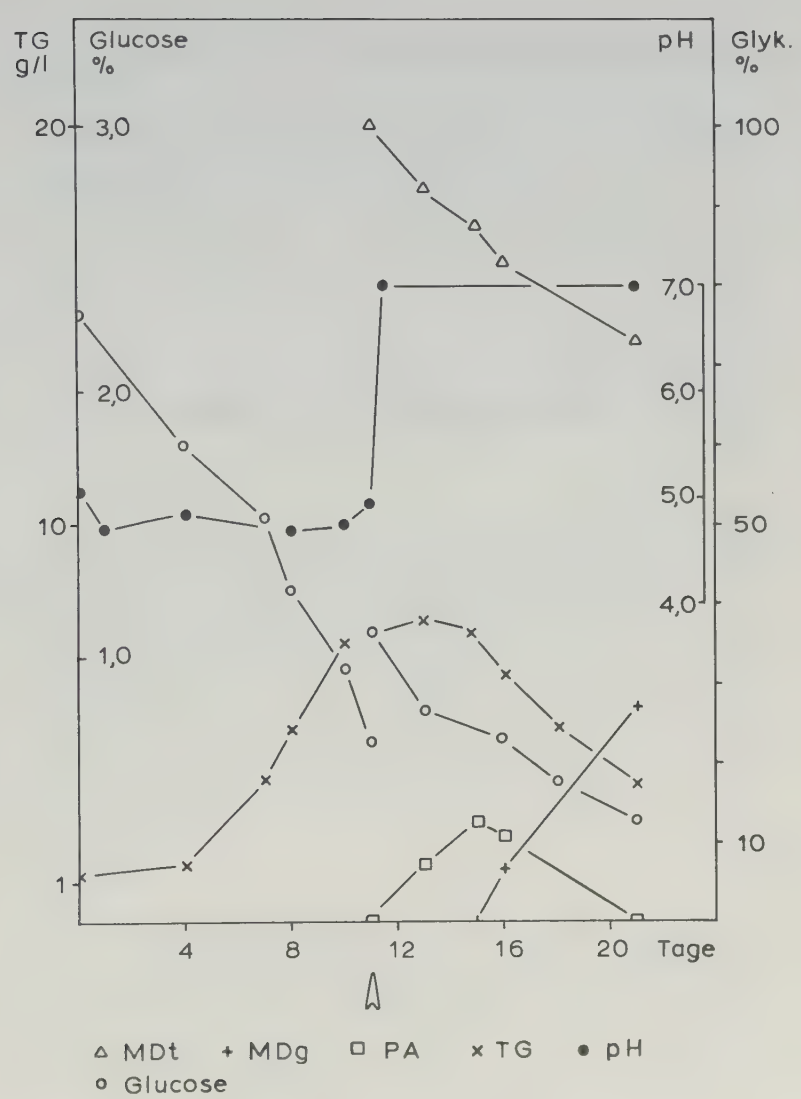


Abb. 48 Fermenterkultur Zellstamm E
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei pH 7,0
in 20 l - Airlift-Fermenter, 200 Nl Luft/h, 24°C.

3. Fermenterkultur Zellstamm 291

Zellkulturen dieses langsamer wachsenden aber in Schüttelkolben selektiv hydroxylierenden Stammes 291 wurden für weitere Fermentationsversuche eingesetzt. 10 Vorzuchtkolben ergaben ein Anfangs-Trockengewicht von 1,2 g/l im 20 l - Fermenter.

Fermenterkultur 291
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei freilaufendem pH
Abb. 49

Der flache Anstieg der Zell-Trockenmasse läßt deutlich erkennen, daß zum Zeitpunkt des Versuches das Wachstum der Fermenterkultur noch nicht optimal war. Eine Beschleunigung trat ein, als die Glucose bis auf 1 % verbraucht war. Am 16. Tag wurde bei einer Rest-Glucosekonzentration von 0,35 auf 1,0 % ergänzt. Nur geringen Schwankungen war der pH-Wert im Lauf des Versuches unterworfen. Von 4,9 nach Inoculation über 4,5 in der Anwachsphase stieg der pH auf 5,1 nach 20 Fermentationstagen.

Die Zugabe von 40 mg/l ß-Methyldigitoxin erfolgte am 11. Tag. Bereits nach 2 Stunden war das Hydroxylierungsprodukt ß-Methyldigoxin nachweisbar. Nach 24 Stunden lagen 55 % ß-Methyldigoxin vor. Innerhalb von 3 Tagen war die 12ß-Hydroxylierung der gesamten Substratmenge abgeschlossen. ß-Methyldigoxin wurde ausschließlich im Kulturfiltrat gefunden. Nebenprodukte traten zu keinem Zeitpunkt des Versuches auf.

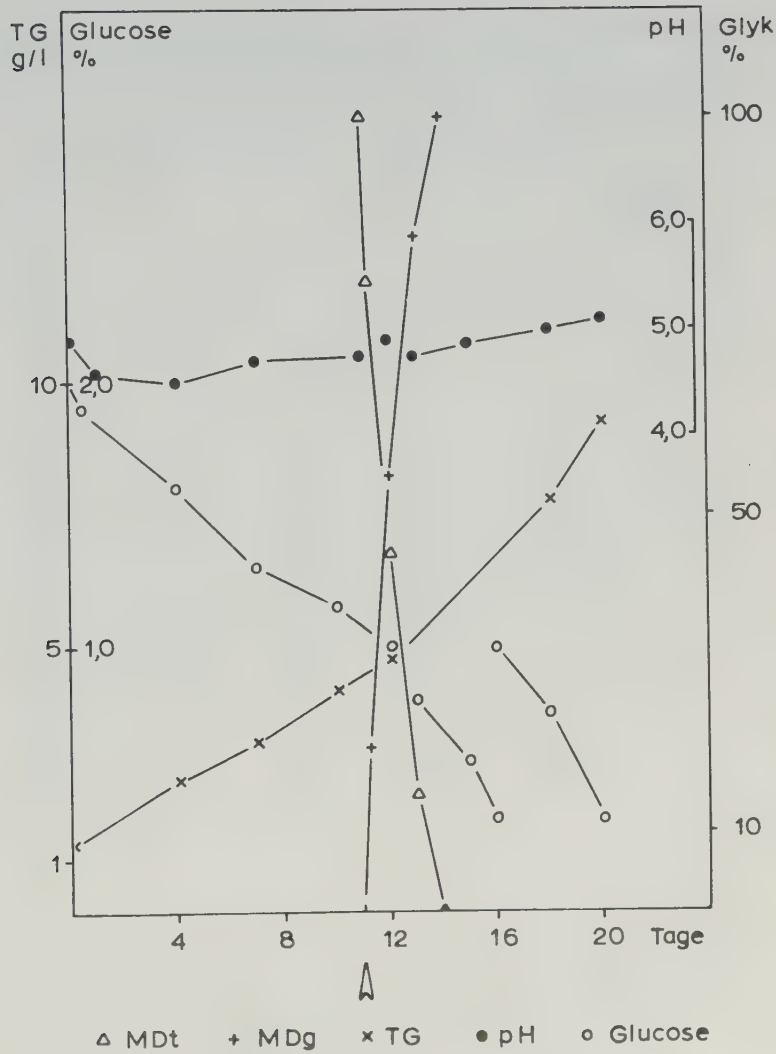


Abb. 49 Fermenterkultur Zellstamm 291
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei freilaufendem pH
in 20 l - Airlift-Fermenter, 200 Nl Luft/h, 24°C.

Die Glykosidverteilung während dieser Fermentation wurde vom Zeitpunkt der ß-Methyldigitoxin-Zugabe an untersucht. Abb. 50 zeigt das Ergebnis:

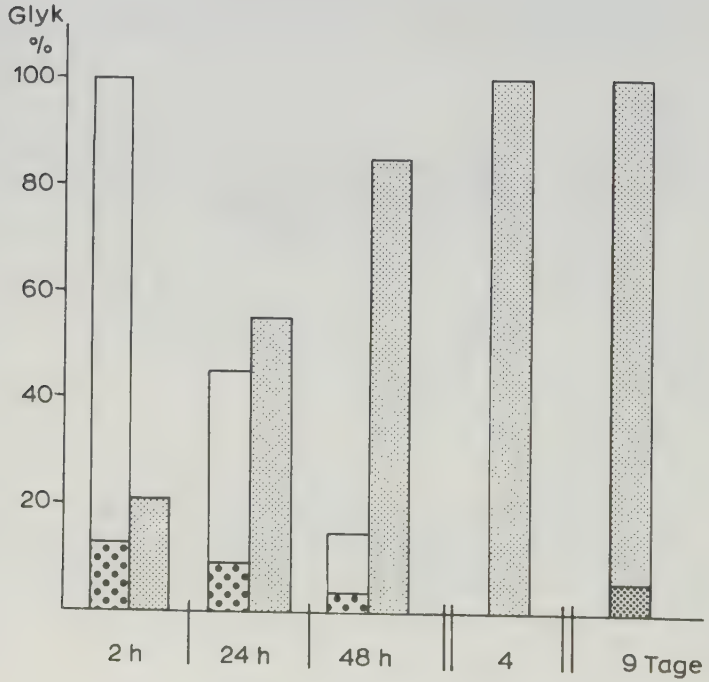


Abb. 50 Glykosidverteilung in der Fermenterkultur 291 nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin.

MDt im Kulturfiltrat, MDt im Gewebe,
MDg im Kulturfiltrat, MDg im Gewebe.

2 Stunden nach beendeter Zugabe von ß-Methyldigitoxin wurden im Kulturfiltrat der Fermenterprobe 21 % ß-Methyldigoxin be-

stimmt. 66 % des Substrates lagen ebenfalls dort vor. 13 % wurden aus dem Gewebeextrakt identifiziert.
Nach 48 Stunden Inkubationszeit hatte die Hydroxylierung im Kulturfiltrat 85 % erreicht. ß-Methyldigitoxin trat noch als Anteil von 11 % im Kulturfiltrat auf, 4 % waren Rest im Gewebe. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte ß-Methyldigitoxin nicht mehr nachgewiesen werden.
Am 9. Tag nach begonnener Umwandlung erschienen 6 % des Reaktionsproduktes in der Gewebefraktion. Entsprechend der am Schüttelkolbenversuch gemachten Beobachtung trat das 12ß-hydroxylierte Glykosid auch in diesem Fermenterversuch im Kulturfiltrat auf und ging erst nach abgeschlossener Umwandlung im weiteren Versuchsverlauf in die Gewebefraktion über.

Das Ergebnis dieser Fermentation stimmt völlig überein mit dem im Schüttelkolben erzielten. Hydroxylierungsrate und Reaktionszeit der in Versuch Abb. 22 beschriebenen Suspensionskultur konnten mit der Fermenterkultur in diesem Versuch reproduziert werden.

Mit der Schüttelkultur 291 war es in Versuch Abb. 42 gelungen, die 100 %ige Hydroxylierung durch erneute Substratzugabe zweimal während derselben Kulturpassage zu wiederholen.
Dies sollte in dem folgenden Fermentationsversuch nachvollzogen werden.

Fermenterkultur 291
Mehrfachzugabe von ß-Methyldigitoxin
Abb. 51

Eine Gesamt-Glykosidmenge von 4,0 g ß-Methyldigitoxin wurde in dieser Fermentation zugesetzt in Einzelgaben zu 40 mg/l. Die erste Zugabe erfolgte am 12. Kulturtag bei einer Glucosekonzentration von 0,5 % im Kulturfiltrat. Weitere Dosierungen wurden in Intervallen von 2 Tagen vorgenommen. Vor jeder neuen Zugabe lagen nur noch geringe Mengen an Substrat vor. Die 12ß-Hydroxylierung war jeweils nach 2 Tagen nahezu vollständig abgelaufen. Die Zeitabstände der Dosierung waren so gewählt, daß keine Unterbrechung der Reaktion eintreten sollte. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umwandlung war gleichbleibend von der ersten bis zur fünften Substratzugabe. Bei Versuchsende erschienen 20 % des ß-Methyldigoxins in der Gewebefraktion, der Rest des Umwandlungsproduktes wurde im Kulturfiltrat gefunden.
In der Darstellung Abb. 51 muß jede Einzelgabe als 100 % verstanden werden; aufgetragen ist nur das hydroxylierte Reaktionsprodukt ß-Methyldigoxin.
Vom 14. Tag der Fermentation ab wurde Glucose diskontinuierlich nachgegeben, sodaß eine mittlere Konzentration von 0,5 % im Kulturfiltrat erhalten blieb.

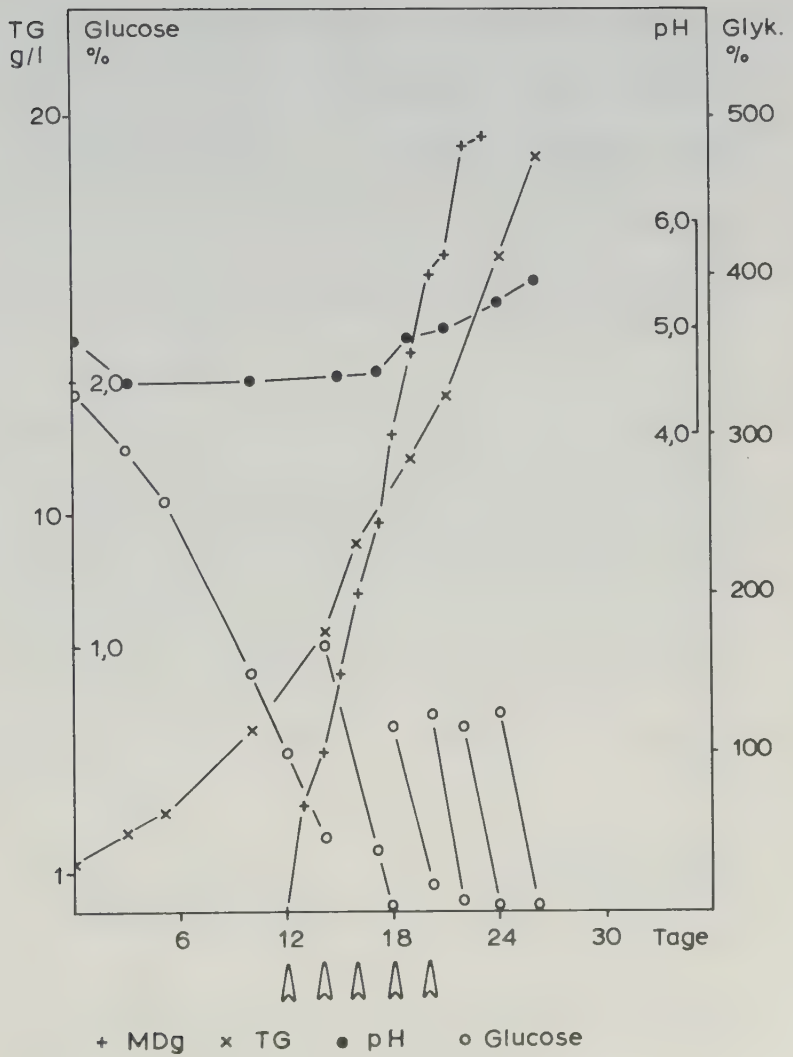


Abb. 51 Fermenterkultur Zellstamm 291
Mehrfachzugabe von ß-Methyldigitoxin (5x40 mg/l)
bei freilaufendem pH im 20 l - Airlift-Fermenter
mit 200 Nl Luft/h, 24°C.

Das Gewebewachstum in dieser Fermentation wurde weder durch die Glykosidmenge noch durch Aethanol als Lösungsmittel beeinträchtigt. Mit einer Zelldichte von 19 g/l Trockenmasse war eine genügende Umwälzung im Fermenter kaum mehr gewährleistet. Weitere Zugabe von ß-Methyldigitoxin in diesem Versuch erschien daher nicht sinnvoll. Die Anzahl der möglichen Substratzugaben könnte erhöht werden durch die Vorverlegung des Umwandlungsprozesses auf einen früheren Zeitpunkt der Fermentation.

Die erforderliche Mindest-Gewebedichte für eine vollständige Hydroxylierung ohne Zellschädigung war zu ermitteln. In der folgenden Fermentation sollte versucht werden, die Belastbarkeit der Zellkultur bezüglich Glykosid-Zugabe zu prüfen. Die ß-Methyldigitoxin-Zugabe im ersten Fermentationsversuch mit Stamm 291 Abb. 49 war am 11. Kulturtag bei einem Gewebe-Trockengewicht von etwa 4,5 g/l durchgeführt worden. Der Zeitraum von der Inoculation bis zur Substratzugabe war derart zu verkürzen, daß die Umwandlung bei halbem Trockengewicht der Zellmasse begonnen wurde.

Fermenterkultur 291
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei verminderter Zelldichte
Abb. 52

5 Tage nach Inoculation war eine Zell-Trockenmasse von 2,3 g/l im Fermenter erreicht. 40 mg/l ß-Methyldigitoxin wurden zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden 35 % als ß-Methyldigoxin identifiziert, nach 48 Stunden 63 %. Zu einem späteren Zeitpunkt des Versuches war ausschließlich ß-Methyldigoxin vorhanden.

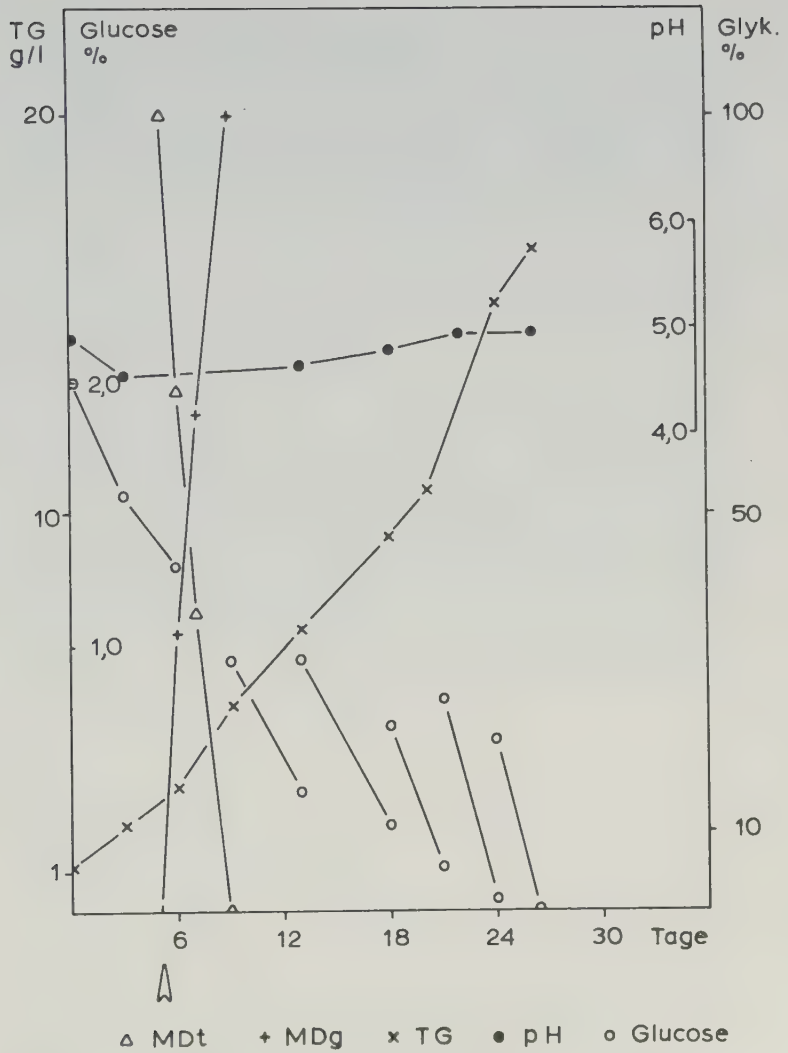


Abb. 52 Fermenterkultur Zellstamm 291
Zugabe von ß-Methyldigitoxin bei verminderter Zelldichte im 20 l - Airlift-Fermenter, 200 Nl Luft/h, pH freilaufend, 24°C.

Die 12ß-Hydroxylierung war somit ebenso schnell und vollständig verlaufen wie nach Zugabe des Substrates bei der doppelten Gewebedichte in Abb. 49. Auch in diesem frühen Wachstumsstadium der Fermenterkultur war keine Zellschädigung durch Glykosid oder Aethanol zu beobachten.
Der pH-Verlauf blieb völlig unbeeinflußt.
Nach abgeschlossener Umwandlung an Tag 9 der Gesamtfermentation lag ß-Methyldigoxin ausschließlich im Kulturfiltrat vor, bis Tag 22 gingen 10 % in die Gewebefraktion über.

Eine Toleranzschwelle war auch mit dieser Versuchsanordnung offensichtlich noch nicht erreicht. Eine weitere Annäherung wäre zu versuchen durch wiederum frühere Zugabe des zu hydroxylierenden Substrates oder durch dessen Konzentrationserhöhung.

Für die Zusammenarbeit und zahlreiche Anregungen in der Fermentation danke ich Herrn Dr. J. Wahl herzlich.

4. Diskussion der Fermenterversuche

Zellstamm E von Digitalis lanata konnte mit gutem Wachstumsergebnis in einem 20 l - Airlift-Fermenter kultiviert werden. Eine Biomasse von 31 g/l Trockengewicht wurde erreicht.
Nach Zugabe von ß-Methyldigitoxin spaltete die Kultur zunächst die Methylgruppe ab und glucosidierte anschließend zu Purpureaglykosid A. Das dabei theoretisch auftretende Zwischenprodukt Digitoxin wurde nicht gefunden.
Die von WAHL (1977) an Stamm 72 gezeigte Möglichkeit, die Hydroxylierungsreaktion durch pH-Steuerung anzuregen, ließ sich bei Stamm E nicht nachvollziehen - obwohl Ergebnisse aus Schüttelkolben mit diesem Stamm einen Einfluß des pH-Wertes auf die Umwandlungsreaktion hatten vermuten lassen. Im Fermenterversuch konnte erst bei einem zellschädigenden pH von 7,0 eine geringe Hydroxylierungsrate erzielt werden. Bis genauere Kenntnisse vorliegen, müßte der pH-Effekt als Stammspezifikum von Zellstamm 72 angesehen werden.

Mit Stamm 291 wurde eine Zellkultur gefunden, deren gute 12ß-Hydroxylierungs-Leistung direkt vom Schüttelkolben in den Fermentermaßstab übertragbar war.
Der pH-Wert wies auch bei längerer Fermentationsdauer des Zellstammes kaum Schwankungen auf. Die Spitze der Gewebe-Trockengewichte, die bei der Kultivierung dieser Fermenterkultur erzielt wurden, lag bei 19 g/l. Größere Zelldichten waren durch Luftrührung auch mit höherer Belüftungsrate nicht mehr umwälzbar. Der Wert von 31 g/l, der mit Stamm E erhalten wurde, war durch den größeren Feinheitsgrad dieser Kultur bedingt.

Bei der Fermentation von Zellstamm 291 ließ sich eindeutig belegen, daß die 12ß-Hydroxylierung nicht an eine bestimmte Wachstumsphase der Zellkultur gekoppelt ist. BOY (1975) hatte aus seinen Ergebnissen mit Zellstamm 72 geschlossen, daß dieser Umwandlungsprozess bevorzugt in der stationären Phase ablief. Es wäre durchaus denkbar, daß ähnlich wie die Stoffproduktion auch die Umwandlung von Sekundärstoffen erst nach beendetem Gewebewachstum verstärkt eintritt. Am Beispiel der Serpentinproduktion in Catharanthus roseus - Zellkulturen wurde diese Erscheinung zuletzt von DÖLLER (1977) beschrieben. Jedoch konnte WAHL (1977) mit der Fermenterkultur des Digitalis lanata - Zellstammes 72 eine gute 12ß-Hydroxylierungsrate auch während der logarithmischen Wachstumsphase erzielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit geschah die Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin durch Zellstamm 291 im Fermenter in jeder Wachstumsphase gleichermaßen schnell und vollständig.

Eine Gesamtmenge von 800 mg ß-Methyldigitoxin wurde innerhalb von 3 Tagen in einem 20 l - Fermenter hydroxyliert entsprechend einer Konzentration von 40 mg/l Substrat. Ein wesentlicher Schritt zur Ausbeutesteigerung gelang durch Mehrfachzugabe des umzuwandelnden Glykosids.

In einer einzigen Fermentation konnte die fünffache Menge ß-Methyldigitoxin hydroxyliert werden durch Zugabe von 5 mal 800 mg im Abstand von je 2 Tagen. Eine Grenze der Belastbarkeit des Zellmaterials war mit diesem Wert von 4,0 g ß-Methyldigitoxin noch nicht erreicht. Es gab keine Anzeichen für toxische Einflüsse von Glykosid oder Lösungsmittel.

Die Glykosid-Wiederfindungsrate bei der Analyse von Fermenterproben betrug 75 %, bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Dieser Verlust war durch die Zugabetechnik bedingt: im Sterilfilter und im Schlauchsystem, durch das die Lösung mittels Membranpumpe in den Fermenter gelangte, wurden erhebliche Rückstände des Substrates festgestellt. Von 40 mg/l eingesetztem ß-Methyldigitoxin wurden 30 mg/l nach der Zugabe im Fermenter als effektiv zur Verfügung stehend wiedergefunden.

Während der Dauer einer Fermentation wurden zwar Verdunstungsverluste durch Nachfüllen von sterilem Wasser ergänzt. Durch die Probenahmen verringerte sich jedoch der Fermenterinhalt in jedem Versuch auf ein Endvolumen von etwa 18 l.

Die theoretische Ausbeute des Fermenterversuchs Abb. 51 mit Mehrfachzugabe von ß-Methyldigitoxin ließ sich nach der fluorimetrischen Messung der Extrakte wie folgt berechnen:
1,68 g ß-Methyldigoxin wurden im Kulturfiltrat des gesamten Fermenterinhalts gefunden und 0,48 g ß-Methyldigoxin im Gesamtgewebe.
Nach persönlicher Mitteilung von Dr. KAISER, Fa. Boehringer, Mannheim, konnten rein kristallin gewonnen werden:
1,52 g ß-Methyldigoxin aus dem Kulturfiltrat und
0,44 g ß-Methyldigoxin aus dem Gewebe.

In einem nächsten Schritt zur Prozessoptimierung sollte die Dauer der Umwandlung herabgesetzt werden durch Annäherung an die Grenze der Belastbarkeit der Zellkultur.

Die Relation eingesetzten Substrates zu Zelldichte der Kultur mußte verschoben werden durch Konzentrationserhöhung zugegebener Substanz oder Zugabe bei geringerer Zelldichte. Es gelang, die Umwandlung bei einer Gewebedichte von 2,3 g/l Trockenmasse zu reproduzieren.

Die Versuchsdauer für eine Substrathydroxylierung von 40 mg/l konnte somit auf 9 Tage Gesamtfermentation verkürzt werden. Dadurch zeigen sich Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung: über eine längere Fermentationsdauer können wiederholt größere Mengen ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin hydroxyliert werden. An dieser Stelle sei hingewiesen auf Versuche von HELMBOLD (1977) zur Steigerung der ß-Methyldigoxin-Ausbeute durch Verwendung verschiedener Zugabetechniken an selektiv hydroxylierenden Zellstämmen von Digitalis lanata. Diese Prozessoptimierung gilt als wesentlicher Faktor für die industrielle Verwertbarkeit der 12ß-Hydroxylierungsreaktion.

Die Gestaltung dieser Umwandlung als kontinuierlicher Prozess sollte erwogen werden. Es wäre jedoch zu entscheiden, ob die Hydroxylierung selbst sinnvoll kontinuierlich durchzuführen ist. Die äußerst schlechte Trennbarkeit von ß-Methyldigitoxin und ß-Methyldigoxin muß als nachteilig angesehen werden. Aufwendige Trennverfahren würden die Rentabilität des Umwandlungsprozesses senken. Denkbar wäre hingegen eine kontinuierliche Fermenterkultur, von der jeweils kleinere Reaktionsfermenter abgeleitet würden.

K Zusammenfassung

Kalluskulturen Digoxin-reicher Pflanzen von Digitalis lanata ssp. lanata und ssp. leucophaea wurden angelegt. Zur Untersuchung des Biotransformationsverhaltens wurden die Kalli in Suspension kultiviert.

Ziel der Arbeit war die Selektionierung von Zellstämmen mit optimaler 12ß-Hydroxylierungskapazität an zugegebenem Digitoxigeninglykosid. Als günstigstes Substrat erwies sich ß-Methyldigitoxin.
Vier Biotransformationstypen ließen sich innerhalb der untersuchten Zellstämme unterscheiden:
selektiv hydroxylierende
hydroxylierende und demethylierende/glucosidierende
selektiv demethylierende und glucosidierende
und nahezu inaktive Zellstämme.
Verantwortlich für das Entstehen der unterschiedlichen Glykosidmuster sind außer stammspezifischen Eigenschaften vor allem Nährmedien-Einflüsse. Über die Verteilung des Substrates in der Zellkultur, die Aufnahmerate in die Zellmasse, wird der Verlauf der Umwandlung gesteuert.

Die selektiv hydroxylierenden Zellstämme 291 und 287 setzten in 3 Tagen 1 mg ß-Methyldigitoxin pro Kolben (25 ml) vollständig zu ß-Methyldigoxin um. Versuche zur Ausbeutesteigerung verliefen positiv. Dabei war Mehrfachzugabe einer einmaligen Konzentrationserhöhung des Substrates eindeutig vorzuziehen. Schüttelkulturen des Stammes 291 hydroxylierten 3 mg ß-Methyldigitoxin pro Kolben (25 ml) innerhalb einer Passage.

An den Substraten Lanatosid A und Digitoxin ergab sich jedoch auch mit diesem Zellstamm keine Hydroxylierung ohne gleichzeitige Desacetylierung beziehungsweise Glucosidierung.

Um die 12ß-Hydroxylierung einer technischen Nutzbarkeit näher zu bringen, wurden Digitalis lanata - Zellkulturen in 20 l - Fermentern mit Luftrührung kultiviert.
Zur Vorbereitung war zunächst Optimierung auf Feinheit der Kultur und Wachstum erforderlich. Eine konstant eingestellte Vorzucht wurde durch Kontrolle des Glucoseverbrauchs während der Kulturpassage erhalten.

Mit der Fermenterkultur E wurde in 24 Tagen Fermentationsdauer ein Zuwachs der trockenen Zellmasse auf 31 g/l erzielt. Zur Hydroxylierung konnte Zellstamm E nicht eingesetzt werden. Sofort nach Zugabe wurde das Substrat zu Purpureaglykosid A umgewandelt. Es wurde versucht, die Hydroxylierung durch pH-Steuerung anzuregen. Jedoch konnte kein pH-Optimum für Hydroxylierung bei intakter Zellstruktur ermittelt werden.

Weitere Fermenterversuche wurden mit Zellstamm 291 durchgeführt. Innerhalb von 3 Tagen war vollständige 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin nachweisbar. Somit ließen sich die Ergebnisse dieses Zellstammes unmittelbar von Schüttelkulturen in den Fermentermaßstab übertragen.

Die Hydroxylierungsleistung erreichte im Fermenter einen Wert von 6 mg/g TG/l pro Tag, gemessen in den ersten 24 Stunden nach Substratzugabe. Eine Zelldichte von 2,3 g/l Trockengewicht am 5. Tag der Gesamtfermentationsdauer erwies sich als ausreichend für die Umwandlung.

Schließlich wurde durch Mehrfachzugabe von Substrat gezeigt, daß die Zellkultur 291 von der beginnenden Wachstumsphase bis zum Endpunkt der Fermentation fortlaufend zur 12ß-Hydroxylierung herangezogen werden konnte. Toxische Einflüsse wurden nicht festgestellt.

Es zeichnet sich die Möglichkeit ab, über längere Versuchsdauer größere Substratmengen umzuwandeln. Bis zur Anwendbarkeit des Verfahrens bleiben weitere Aufgaben der Fermentertechnik zu lösen.

L Literaturverzeichnis

ALFERMANN, A.W.
Untersuchungen zur Anthocyansynthese in Kalluskulturen von Daucus carota L.
Dissertation Tübingen (1973)

AUTERHOFF, H.
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie 8. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1976)

BÄRISCH,H., F.FISCHER, H. PÖTTER und H.J. SCHMIDT
Zur Umwandlung von Digitoxigeninglykosiden in Digoxin
Pharmazie 27, 415 (1972)

BAJAJ, Y.P.S. und M.BOPP
Gewebekulturen in der angewandten Botanik
Angew. Botanik 45, 115 (1971)

BECKER, H.
Stoffproduktion in pflanzlichen Callus- und Organkulturen
Mitt. Dtsch. Pharmaz. Gesellschaft 12, 273 (1969)

BERLIN, J. und W. BARZ
Stoffwechsel von Isoflavonen und Cumöstanen in Zell- und Callussuspensionskulturen von Phaseolus aureus Roxb.
Planta 98, 300 (1971)

BLAKELY, L.M. und F.C. STEWARD
Growth and Development of Cultured Cells
Amer. J. Bot. 51, 809 (1964)

BOY, H.M.
Umwandlung von Herzglykosiden, Digitoxigenin und Digitoxigenin-Derivaten durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation Tübingen (1975)

BÜCHNER, S.A. und E.J. STABA
Preliminary chemical examination of Digitalis tissue cultures for cardenolides
J. Pharm. Pharmacol. 16, 733 (1964)

CAREW, D. und E.J. STABA
Plant tissue culture: its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies
Lloydia 28, 1, 1 (1965)

CHARNEY, W. und H.L. HERZOG
Microbial Transformation of Steroids
Academic Press, New York, London (1967)

DÖLLER, G.
Produktion von Indolalkaloiden in Suspensionskulturen von Catharanthus roseus (L.) G. Don
Dissertation Tübingen (1977)

FRIEDRICHSON, J.G.
Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

FURUYA, T., M. HIROTANI und T. SHINOHARA
Biotransformation of Digitoxin by Suspension Callus Cultures of Digitalis purpurea
Chem. Phar. Bull., Tokyo 18, 1080 (1970)

FURUYA, T., K. SYONO, M. HIROTANI, A. IKUTA, M. HIKICHI, K. KAWAGUCHI und K. MATSUMOTO
Chemical constituents and transformation capacity of medicinal plant tissue cultures
Prov. IV IFS Ferment. Technol. Today, 705 (1972)

GAUTHERET, R.J.
La culture des tissues végétaux
Masson et Cie., Paris (1959)

GRAVES, J.M.H. und W.K. SMITH
Transformation of Pregnenolone and Progesterone by Plant Cells
Nature 214, 1248 (1967)

GRÜTZMANN, K.-D.
Über Zell- und Gewebekulturen
Pharmazie 21, 340 (1966)

HAGEDORN, W.
Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

HAMMERSTEIN, F. und F. KAISER
Quantitative Direktauswertung von Arzneipflanzenextrakten auf Dünnschichtchromatogrammen
Planta Med. 21, 5 (1972)

HEINS, M., J. WAHL, F. KAISER und E. REINHARD
Preparation of ß-methyldigoxin by hydroxylation of ß-methyldigitoxin in fermenter cultures of Digitalis lanata
Planta Med. 33, 1 (1978) im Druck

HELMBOLD, H.
Steroide in Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation Tübingen (1977)

HELMBOLD, U.
Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

HILDEBRANDT, A.C.
in: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 5. Band, 382
Springer-Verlag Berlin (1962)

HIROTANI, M. und T. FURUYA
Restoration of Cardenolide-Synthesis in Redifferentiated Shoots from Callus Cultures of Digitalis purpurea
Phytochemistry 16, 610 (1977)

JENSEN, K.B.
Paper Chromatography of Cardiac Glycosides and Aglykones from Digitalis purpurea
Acta pharmacol. et toxicol., København 9, 99 (1953)

KAISER, F.
Die papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden
Chem. Ber. 88, 556 (1955)

KAISER, F.
Chromatographische Analyse der herzwirksamen Glykoside von Digitalis-Arten
Arch. Pharm. 299, 263 (1966)

KARTNIG, Th.
Cardiac Glycosides in Cell Cultures of Digitalis in:Proceedings of Life Sciences
Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application
ed. by W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1977)

KARTNIG, Th., U. RUSSHEIM und B. MAUNZ
Beobachtungen über das Vorkommen und die Bildung von Cardenoliden in Gewebekulturen aus Digitalis purpurea und Digitalis lanata
Planta Med. 29, 275 (1976)

KEDDE, D.L.
Pharm. Weekblad 82, 741 (1947)

LIGETI, G.
Die Extraktion und die chemische Auswertung von Digitalis-lanata-Blättern mit Hilfe der Papierchromatographie
Pharmazie 12, 433 (1957)

MELCHERS, G.
Einige genetische Gesichtspunkte zu sogenannten Gewebekulturen
Ber. dtsch. bot. Ges. 78, 21 (1965)

MIYATAKE, K.
Pharm. Bull. 5, 157 (1957)

MURASHIGE, T. und F. SKOOG
Medium for Tobacco Tissue Cultures
Physiol. Plantarum 15, 433 (1962)

MUTSCHLER, E.
Arzneimittelwirkungen 1. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1970)

NITSCH, J.P. und C. NITSCH
Haploid Plants from Pollen Grains
Science 163, 85 (1969)

NOZAKI, Y., M. MAYAMA, K. AKAKI und D. SATOH
Microbial 12ß-Hydroxylation of Digitoxin
Agr. Biol. Chem. 29, 783 (1965)

PILGRIM, H.
"Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzyme" Aktivität in Keimlingen und in vitro kultivierten Geweben von Digitalis purpurea
Phytochem. 11, 1725 (1972)

REINHARD, E.
Probleme der Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche "Gewebekulturen"
Dtsch. Apoth. Ztg. 107, 1203 (1967)

REINHARD, E.
Biotransformations by Plant Tissue Cultures
in: Tissue Culture and Plant Science
Proc. 3rd Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture
Academic Press, London New York San Francisco (1974)

REINHARD, E., H.M. BOY und F. KAISER
Umwandlung von Digitalis-Glykosiden durch Zellsuspensionskulturen
Planta Med. Suppl., 163 (1975)

SONANINI, D.
Beiträge zur Dünnschichtchromatographie von Digitalis-Cardenoliden
Pharm. Act. Helv. 39, 673 (1964)

STABA, E.J.
Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures I: Nutritional requirements in tissue cultures of Digitalis lanata and purpurea
Pharm. Sci. 51, 249 (1962)

STAHL, E.
Dünnschicht-Chromatographie
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)

STEIDLE, W.
Quantitative Bestimmung von Hexadienoliden in Meerzwiebelextrakten
Ann. Chem. 662, 126 (1963)

STEWARD, F.C., P.V. AMMIRATO und M.O. MAPES
Growth and development of totipotent cells; some problems, procedures and perspectives
Ann. Bot. 34, 761 (1970)

STOHS, S.J. und E.J. STABA
Production of Cardiac Glycosides by Plant Tissue Cultures IV: Biotransformation of Digitoxigenin and Related Substances
J. pharm. Sci. 54, 56 (1965)

STREET, H.E. und G.G. HENSHAW
Cells and Tissues in Culture, Willmer ed., Bd. 3
Academic Press, London - New York (1966)

TEUSCHER, E.
Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen
Pharmazie 28, 6 (1973)

TSCHESCHE, R., R. BECKER und R. HOMBACH
Hydroxylierungen im Verlauf der Cardenolidbiogenese
Z. f. Naturf. 23 b, 1615 (1968)

TSCHESCHE, R., R. HOMBACH, H. SCHOLTEN und M. PETERS
Neue Beiträge zur Biogenese der Cardenolide in Digitalis lanata
Phytochem. 9, 1505 (1970)

TSCHESCHE, R.
Zur Biogenese der Cardenolid- und Bufadienolidglykoside
Planta Med. Suppl. 4, 34 (1971)

TULECKE, W. und L.G. NICKELL
Production of large amounts of plant tissue by submerged culture
Science 130, 863 (1959)

WAHL, J.
Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen und 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation Tübingen (1977)

WEILER, E.
Hausarbeit zur 1. Staatsprüfung für Lehramt am Gymnasium
Ruhr-Universität Bochum (1974)

WICHTL, M. und R. FREIER
Zur Biosynthese der Lanatoside in Digitalis lanata Ehrh.
Österr. Apoth. Ztg. 14, 275 (1976)

WHITE, P.R.
The Cultivation of Animal and Plant Cells
Thames and Hudson, London (1954)

Lebenslauf

1948	am 2. April geboren in Lüneburg als Tochter von Kurt und Elfriede Heins
1954-1958	Besuch der Volksschule in Sinzig/Rhein
1958-1966	Besuch des Staatlichen Neusprachlichen Gymnasiums in Andernach
1966	am 20. Oktober Reifeprüfung
1966-1968	Praktikantenzeit in der Löwen-Apotheke, Bonn
1968	am 5. September Pharmazeutische Vorprüfung in Köln
1968-1969	Tätigkeit als Vorexaminierte in der Schloß-Apotheke in Sinzig
SS 1969- WS 1971/72	Studium der Pharmazie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn
1972	am 12. April Pharmazeutische Prüfung
1972	am 14. Juli Approbation als Apothekerin
1972-1973	Tätigkeit in der Hof-Apotheke in Köln
1974-1975	am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt
1976-1977	Fortführung der Arbeit als wissenschaftliche Angestellte im Rahmen eines Forschungsprogrammes des Bundesministeriums für Forschung und Technologie

Meine akademischen Lehrer waren:
H. P. T. Ammon, H. Auterhoff, K. W. Glombitza, F. Gstirner, H. Nettesheim, E. Reinhard, H. J. Roth, W. Schumacher, M. Steiner, R. Tschesche, H. Wahl, F. Zymalkowski.